



**Universidad
Zaragoza**

GRADO EN NUTRICIÓN HUMANA Y DIETÉTICA

IMPACTO DE LA MICROBIOTA EN LAS CARACTERÍSTICAS DE
PANES ELABORADOS CON MASAS MADRE

IMPACT OF MICROBIOTA ON SOURDOUGH BREADS
CHARACTERISTICS

AUTOR:

ANA CRISTINA CORTÉS OTAL

TUTORES:

ANA MARÍA FERRER MAIRAL

ÁREA DE TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS

ANTONIO REZUSTA LOPEZ

AREA DE MICROBIOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS

ANA ISABEL LOPEZ CALLEJA

FACULTATIVO ESPECIALISTA MICROBIOLOGÍA

Junio 2016

RESUMEN

La masa madre o masa ácida es una mezcla de harina y agua, espontáneamente fermentada por bacterias lácticas y levaduras, con capacidad acidificante y leudante. Se trata de una tecnología antigua que ha sido recuperada, ya que la elaboración de pan con masa madre permite mejorar la calidad nutricional, sensorial y la vida útil de los productos con respecto a los panes convencionales. Estudios previos muestran la diversidad de especies microbianas en masas madres de diferentes procedencias.

Los objetivos de este trabajo son caracterizar la microbiota de diferentes masas madres tradicionales de Aragón y evaluar los efectos de su incorporación en la calidad de los panes.

Para la consecución de estos objetivos se ha realizado una toma de muestras en diferentes panaderías artesanas aragonesas, la cuantificación e identificación de los microorganismos presentes en las masas, el estudio de sus características tecnológicas y la caracterización físico-química y sensorial de los panes resultantes de su utilización.

Los resultados obtenidos muestran que las muestras de masa madre presentaron diferencias físico-químicas, fundamentalmente en cuanto a las características de acidificación. La identificación microbiana mediante espectrometría de masas MALDI TOF mostró que *Saccharomyces cerevisiae* fue la especie más frecuente en las masas analizadas. En cuanto a los panes, se observaron diferencias de textura y color entre las muestras, tanto en las medidas instrumentales como sensoriales, donde se valoró positivamente los aromas a tostado, harina y cereal.

Los datos obtenidos de los diferentes parámetros analizados, mostraron que la adición de masa madre durante la producción del pan repercutía significativamente en las características físico-químicas, atributos sensoriales y texturales de los panes resultantes.

ÍNDICE

RESUMEN	
LISTADO DE ABREVIATURAS.....	1
1. INTRODUCCIÓN	3
1.1 La masa madre	3
1.2 Panes elaborados con masa madre	9
1.3 Efectos sobre la salud.....	13
2. OBJETIVOS	15
3. MATERIAL Y MÉTODOS	16
3.1. Diseño de cuestionarios y obtención de los resultados	16
3.2 Material estudiado.....	16
3.3 Metodología para la caracterización de las masas madre	17
3.4 Caracterización de los panes elaborados a partir de masa madre	19
3.5 Análisis sensorial	23
3.6 Análisis estadístico.....	24
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	25
4.1 Encuesta sobre el procedimiento de elaboración.	25
4.2 Caracterización de las masas madres	26
4.3 Caracterización microbiológica de las masas madres	29
4.4 Caracterización de los panes.....	31
5 CONCLUSIONES	47
AGRADECIMIENTOS.....	48
6 BIBLIOGRAFÍA.....	49
ANEXO 1 – ENTREVISTA A LOS PANADEROS	52
ANEXO 2. HOJA EVALUACIÓN ANÁLISIS SENSORIAL.....	53

LISTADO DE ABREVIATURAS

- BAL: Bacterias ácido lácticas
- EPS: Exopolisacáridos
- DY (Dough Yield): Rendimiento de la masa
- CO₂: Dióxido de carbono
- A_w: Actividad agua
- *L.* : Lactobacillus
- BOE: Boletín oficial del estado
- MALDI TOF: Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight
- BHI: Infusión de cerebro y corazón
- TSA: Agar de triptena de soja
- TPA: Texture Profile Analyse
- ROI: Región de interés
- RGB: Red, Green, Blue
- CIELAB: Sistema CIE L* a* b*
- L* a* b*: Coordenadas CIELAB
- CIE: Comission Internationale de l'Éclairage
- ANOVA: Análisis de Varianza

ANTECEDENTES

Los panes seleccionados para la realización de este estudio pertenecen a pueblos próximos de la comarca de las Cinco Villas, provincia de Zaragoza (Aragón). Biel, Luesia, Uncastillo, Sadaba y Pinsoro son los nombres de los pueblos cuyas panaderías siguen elaborando su pan de manera tradicional.

Con el paso del tiempo, las herramientas de trabajo de estas panaderías han ido evolucionando, dando lugar a cambios parciales en los procedimientos utilizados para la elaboración de sus productos finales. Sin embargo, la masa madre usada ha pasado de generación en generación hasta los actuales obradores, dando lugar a productos con las mismas características sensoriales que en antaño.

Es por ello que estas masas madre son un bien muypreciado, inimitable y característico de cada uno de estos pueblos.

Con el fin de preservar el anonimato de las técnicas utilizadas por cada panadería, se creó un sistema codificado que asignó al azar una letra a cada una de las panaderías, siendo las letras: A, B, C, D y E.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 La masa madre

La masa madre es una mezcla de harina, agua y en algunas ocasiones pequeñas cantidades de sal que es fermentada de manera espontánea por levaduras metabólicamente activas y cepas de bacterias ácido lácticas (BAL), predominantemente heterofermentativas. La acción de éstas produce un aumento del volumen de la masa por formación de gas, así como la aparición de metabolitos de ácido láctico y acético, lo que da lugar a una acidificación de la masa aportando al producto final un sabor característico (De Vuyst and Neysens, 2005; Gobbetti et al., 2013).

El uso de BAL y levaduras salvajes para, mediante una fermentación espontánea, elaborar alimentos, podría haber sido uno de los primeros procesos biotecnológicos empleados por el hombre. Se cree que este mecanismo fue descubierto de manera casual al dejar una masa de harina y agua durante un largo periodo de tiempo en un lugar cálido y húmedo, lo que favoreció el desarrollo de la microflora. Los productos elaborados con BAL y levaduras datan de la era babilónica. Sin embargo, la primera referencia clara del uso de masa madre en la elaboración de pan no se tiene hasta el 1500 ac en Egipto, donde se guardaba parte de la masa para añadirla al día siguiente durante el mismo proceso de elaboración. Posteriormente esta técnica fue utilizada por otras civilizaciones como Griegos, Romanos, Bárbaros y Árabes, hasta nuestros días donde el pan forma parte de la base de la actual dieta mediterránea (Hammes and Gänzle, 1998; Rupesh and Shraddha, 2011).

En estos últimos años se ha producido un incremento de la elaboración de panes con masa madre, fundamentalmente asociado a la concienciación de la sociedad sobre los beneficios y mejoras que conlleva este procedimiento. La masa madre no solo puede adicionarse a panes, sino también a otros productos de panadería con características similares: panettones, panes franceses, galletas de soda, etc.

La mayoría de las propiedades de la masa madre deriva de la actividad metabólica de las BAL: fermentación láctica, proteólisis, síntesis de compuestos volátiles, antimoho y antihilamiento, defecto producido por crecimiento de *Bacillus* (Gobbetti et al., 1999; Hammes and Gänzle, 1998).

El proceso de fermentación de la masa madre modifica la reología del producto final. Cuando la masa madre fermenta, da lugar a una disminución de la elasticidad y viscosidad de las redes de gluten y al ser añadida a otras masas, produce masas menos elásticas y más suaves. Estos cambios pueden ser controlados mediante el ajuste del tiempo y el contenido de cenizas que produce la harina durante el proceso de fermentación (Charmaine et al., 2004).

También influyen factores endógenos derivados de los cereales y otras materias primas utilizadas (hidratos de carbono, fuentes de nitrógeno, minerales, lípidos, ácidos grasos libres ó enzimas) así como factores exógenos presentes durante el proceso (temperatura, rendimiento de la masa (DY), oxígeno, tiempo de fermentación y número de etapas, etc). Estos últimos pueden ser modificados o

controlados e influyen de manera directa sobre la microbiota presente en la masa madre y las características de los productos horneados con levadura (Hammes and Gänzle, 1998).

1.1.1 Tipos de masas madre

Las masas madre se dividen en 3 grupos:

- Masa madre tipo I o proceso tradicional: producidas mediante técnicas tradicionales, se caracterizan por realizar refrescos diarios manteniendo así los microorganismos metabólicamente activos. El refresco consiste en mezclar parte de la masa madre original con harina y agua, y posteriormente dejarlo fermentar. Con este método se asegura tanto la regulación del crecimiento de los microorganismos como la producción de sus metabolitos. En masas madres con harina de trigo y/o centeno predominan las bacterias de la especie *Lactobacillus sanfranciscensis* estas deben coexistir con otras bacterias heterofermentativas ácido lácticas como pueden ser: *Lactobacillus pontis*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus fructivorans* y levaduras como *Candida milleri*, *Candida holmii*, *Saccharomyces cerevisiae* y *Saccharomyces exiguus*. Este tipo de masas consiguen buenas fermentaciones por lo que no precisan de adición de levaduras de panadería.

- Masa madre tipo II o tipo industrial: Se obtiene mediante una única fermentación de 15-20 horas con posterior almacenaje durante largos periodos de tiempo. Suelen ser líquidas y no son adecuadas para levar, sino que son utilizadas para acidificar y mejorar características organolépticas. La composición de BAL y levaduras puede ser elegida por la industria en función del producto a desarrollar. Es necesaria la adición de levaduras de panadería ya que las propias de la masa están inhibidas.

- Masa madre tipo III o proceso industrial: Masa madre seca ó deshidratada. Usada principalmente por la industria panadera por su rápida elaboración y constante calidad en los productos finales, asemejándolos a los producidos por las masa madre tipo I. Es necesaria la adición de levaduras de panadería. Las BAL son: *Pediococcus pentosaceus*, *Lactobacillus Plantarum* y *Lactobacillus brevis* (Decock and Cappelle, 2005).

En algunos casos se incluye un cuarto tipo de masa madre denominado masa de esponja. Este método pretende mejorar la calidad final de los productos mediante la aclimatación de la levadura panadera (*Saccharomyces cerevisiae*) (Corsetti, 2013; Corsetti and Settanni, 2007).

Tabla 1. Clasificación de masas madre. Fuente: (Brandt, 2007).

Productos	Materiales crudos	Características	TTA*	Dosificación de harina (%)
Masas madre deshidratadas	Centeno, trigo, trigo duro, avena, arroz, espelta, harina de trigo sarraceno, harina de germen de cereal, harina de malta	Flavor concentrado, disminución de la dosis	40 – 220	1 - 6
Masa madre en pasta	Avena, trigo, harina de espelta, harina de germen de cereal, harina de malta, granos, brotes, hidrocoloides (goma Guar, Xantana, etc)	Aporta sabores volátiles de masa madre, alta proporción de harina fermentada en la masa final	25 – 100	3 - 30
Masa madre líquida	Avena, trigo, trigo duro, espelta, harina de avena, harina de germen de cereal, harina de malta, sal, etc	Bombeabilidad, aporta sabores volátiles	30 – 150	1 - 10
Masa acidificada (polvo)	Harinas pregelatinizadas, ácidos orgánicos, en ocasiones se añaden masas madre deshidratadas	Concentración de ácido, disminución de la dosis	> 1000	0.5 - 1.5
Masa acidificada (líquida/en pasta)	Harina de avena o trigo, ácidos orgánicos, hidrocoloides, en ocasiones masa madre	Concentración de ácido, disminución de la dosis, bombeabilidad (líquida)	> 400	0.5 - 3

*TTA: ml 0,1 M NaOH per 10g product.

1.1.2 Factores que influyen en las características de las masas madre

Algunos de los factores que pueden influir en las propiedades de la masa madre son:

- Índice de la masa (DY): Proporción entre la harina y el agua que posee la masa madre. Este valor influirá de manera significativa en el carácter sensorial de la masa madre. Aquellas masas con consistencias más firmes, es decir, con un DY más bajo, darán lugar a una mayor producción de ácido acético y menor cantidad de ácido láctico y, al contrario, aquellas masas madre que presenten una consistencia mas líquida, con un DY más alto, sufrirán un proceso de acidificación más rápido debido a la mejor difusión de los ácidos orgánicos producidos en el medio. La fórmula para realizar este cálculo es la siguiente:

$$\text{Rendimiento de la masa} = \frac{(\text{Cantidad de harina} + \text{Cantidad de agua}) \times 100}{\text{Cantidad de harina}}$$

Fuente: (Chavan and Chavan, 2010; Rupesh and Shraddha, 2011; Spicher and Stephan, 1999).

- Temperatura: Es uno de los factores más importantes, influye tanto sobre la acidificación del medio como sobre la composición microbiana de la masa madre. La temperatura juega un papel fundamental y necesario para el correcto desarrollo y crecimiento de la microflora, evitando su pérdida durante los refrescos. Esta pérdida puede suceder si la temperatura no es controlada. Las temperaturas óptimas de crecimiento de los *Lactobacillus* son de 30 – 40°C y de las levaduras 25 – 27 °C. El uso de

temperaturas más elevadas, aumento del contenido de agua y utilización de la harina integral mejoran la producción de ácidos en masas madre de trigo (Rupesh and Shraddha, 2011).

- “Starters” o cultivos iniciadores: Hace referencia a la microbiota utilizada para llevar a cabo la fermentación de la masa. Las BAL presentes en las masas madres son muy variadas y complejas, pero pueden distinguirse dos grupos; heterofermentativas y homofermentativas. Las masas madres deben poseer una serie de BAL en proporciones adecuadas que aseguren la correcta acidificación y aromatización de la masa (Rupesh and Shraddha, 2011).

- Acidez titulable y pH: ambos parámetros juegan un papel importante durante la fermentación. Al comienzo de la fermentación tanto la acidez como el pH mantienen sus niveles constantes. En la fase intermedia, la acidez titulable aumenta debido a la acción de las levaduras y durante la etapa final, las levaduras desaparecen y la acidez titulable y el pH dependen de las BAL del sistema. Las levaduras presentes en la masa madre no se ven prácticamente afectadas por la presencia de ácido láctico, sin embargo, si por el ácido acético.

El pH puede influir en el valor nutritivo ya que la acidificación del medio activa las fitasas del cereal, aumentando la disponibilidad de nutrientes en el pan (De Vuyst and Neysens, 2005).

La acidificación de la masa madre ó de la masa de pan producirá un cambio sobre los componentes que forman la estructura de esta, como en el caso del gluten, almidón y arabinoxylanos. La acidificación produce un hinchamiento en el gluten como ya es conocido (Arendt et al., 2007).

El pH de las masas madre varía dependiendo del proceso de elaboración, de los cultivos iniciadores utilizados y del tiempo de fermentación pero, para las de trigo, el pH oscila generalmente entre 3.5 a 6 (Rupesh and Shraddha, 2011).

La acidificación del medio produce efectos secundarios sobre la actividad bacteriana y enzimática del cereal. Se han descrito proteasas de harina de trigo que tienen su actividad óptima a un pH de 4. Esto significa que la proteólisis a estos pH puede dar lugar a repercusiones sobre la cantidad de aminoácidos; que será mayor en masas acidificadas que en las no acidificadas, así como en una mejora de la reología de la masa y de la textura del pan (Corsetti, 2013).

- Sustrato: Uno de los componentes en mayor proporción de la masa madre y por lo tanto uno de los factores más importantes. El contenido en cenizas es importante para determinar el grado de la harina y su tasa de extracción. El contenido de ceniza producido por el salvado es 20 veces superior a la del endospermo y en los núcleos pequeños la relación aún es mayor (Matz, 1996; Posner, 2000) .

El salvado contiene la mayor cantidad de los minerales y micronutrientes presentes en el grano y necesarios para el crecimiento de las BAL. La proporción de ceniza en la masa madre influye en la actividad de las BAL, siendo a mayor cantidad mayor actividad. La actividad enzimática también

depende del sustrato, a mayor actividad de la enzima amilasa, mayor cantidad de azúcares simples disponibles para ser usados por la microflora durante su crecimiento (Rupesh and Shraddha, 2011).

1.1.3 Microorganismos de la masa madre

La masa madre se caracteriza por ser un complejo ecosistema microbiano, donde las BAL son los microorganismos predominantes. La relación levaduras - BAL es de 1:100 (Gobbetti et al., 1994 and Ottogalli et al., 1996).

La reología, el flavor y las propiedades nutritivas que lo caracterizan derivan de la acción fermentativa de estas.

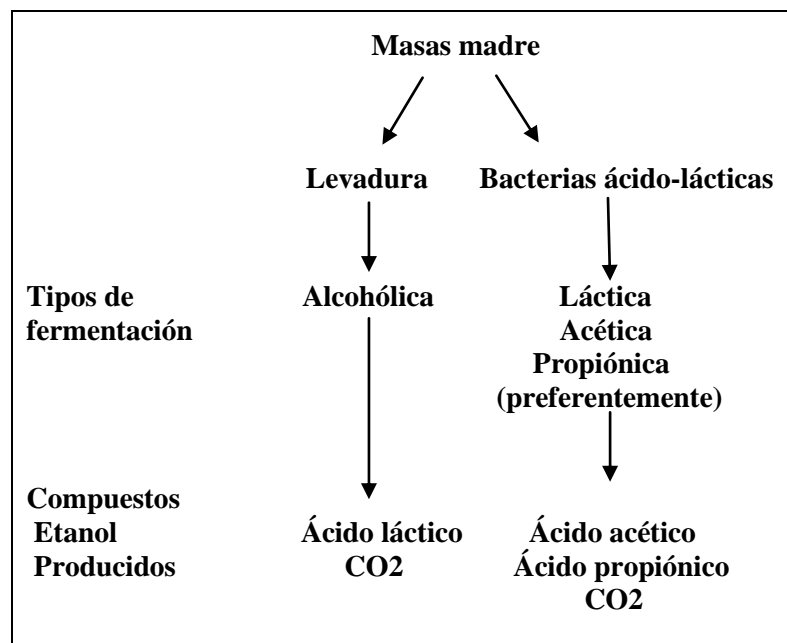


Imagen 1. Productos generados por la acción de las fermentaciones. Fuente: (Gil Hernández, 2009)

1.1.4 Bacterias Ácido- Lácticas

La clasificación de las BAL se remonta a 1919 por Orlando Jensen, se trata de un diverso grupo de organismos Gram-positivos, anaerobios tolerantes, formadores o no de esporas, sin motilidad, con forma de cocos ó bacilos y catalasa negativos. Son microorganismos quimoorganotróficos que solo crecen en medios complejos.

Las BAL producen una serie de metabolitos derivados de su acción como son; ácido propiónico, ácido láctico, sustancias antimicrobianas, bacteriocinas, peróxido de hidrógeno, exopolisacáridos (EPS), etc, que dan lugar a cambios en el flavor e inhiben el crecimiento de organismos esporádicos relevantes.

Atendiendo a la producción de estos metabolitos, las BAL pueden ser clasificadas en dos grupos:

- **Homofermentativas:** Transforman la glucosa en ácido láctico. A este grupo pertenecen *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Enterococcus* y *Streptococcus* entre otros.
- **Heterofermentativas:** Transforman la glucosa en ácido láctico, etanol y CO₂. Este grupo está compuesto por: *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc* y *Pediococcus*.

Las primeras son usadas para la fermentación de la mayoría de los alimentos, las segundas han mostrado unos mejores resultados en las masas madre, sobre todo en las elaboradas de forma tradicional (Gobbetti et al., 2005; Parra, 2010).

Tabla 2. Especies de *Lactobacillus* generalmente asociados con la fermentación de masas madre o encontrados en la fermentación de la masa madre (Corsetti and Settanni, 2007).

Heterofermentativos obligados		Heterofermentativos facultativos	Homofermentativos obligados
<i>L. acidifaridae</i>	<i>L. brevis</i>	<i>L. plantarum</i>	<i>L. amylovorus</i>
<i>L. buchneri</i>	<i>L. fermentum</i>	<i>L. pentosus</i>	<i>L. acidophilus</i>
<i>L. fermentum</i>	<i>L. fructivorans</i>	<i>L. alimentarius</i>	<i>L. delbrueckii subsp. delbrueckii</i>
<i>L. frumenti</i>	<i>L. hilgardii</i>	<i>L. paralimentarius</i>	<i>L. farciminis</i>
<i>L. panis</i>	<i>L. pontis</i>	<i>L. casei</i>	<i>L. mindensis</i>
<i>L. reuteri</i>	<i>L. rossiae</i>		<i>L. crispatus</i>
<i>L. sanfranciscensis</i>	<i>L. siliginis</i>		<i>L. johnsonii</i>
<i>L. spicheri</i>	<i>L. zymae</i>		<i>L. amylolyticus</i>

1.1.5 Levaduras

Las levaduras son un grupo muy amplio de hongos microscópicos, unicelulares ó filamentosos, que se reproducen por gemación o bipartición asexualmente y por ascosporas o basidiosporas durante el ciclo de reproducción sexual. Las levaduras obtienen la energía que necesitan mediante la fermentación de azúcares, dando lugar a metabolitos más simples y CO₂ en forma de gas.

Las levaduras que se encuentran formando parte de la masa madre deben soportar medios con un pH bajo, concentraciones altas de hidratos de carbono y elevadas concentraciones de BAL.

Las levaduras predominantes dentro de las masas madres pertenecen a la clasificación *Phylum Ascomycota*; específicamente a la división *Saccharomycotina* y *Taphrinomycotina*. También podemos encontrar *Casidiomycota*; subdivisión *Urediniomycetes*, entre otras.

Tabla 3. Levaduras más comunes en las masas madres. Fuente: (Gobbetti, 1998; Huys et al., 2013).

Levaduras	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Pichia membranifaciens</i>
<i>Candida humilis</i>	<i>Candida parapsilosis</i>
<i>Pichia kudriavzevii</i>	<i>Candida stellata</i>
<i>Kazachstania exigua</i>	<i>Candida tropicalis</i>
<i>Torulaspora delbrueckii</i>	<i>Kazachstania unispora</i>
<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	<i>Kluyveromyces marxianus</i>
<i>Candida glabrata</i>	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>
<i>Candida milleri</i>	<i>Saccharomyces pastorianus</i>

La variabilidad en el número y tipo de especies que se encuentran depende de varios factores como son: grado de hidratación, tipo de cereal utilizado, temperatura de fermentación y de mantenimiento, etc. Las levaduras convierten los azúcares en dióxido de carbono (CO₂) y etanol, lo que da lugar a un aumento del volumen y del flavor del producto (Corsetti and Settanni, 2007).

Con frecuencia se suelen añadir durante la elaboración del producto final disminuyendo así, su tiempo de elaboración.

1.2 Panes elaborados con masa madre

El pan es un alimento básico que forma parte de la dieta tradicional en Europa, Oriente Medio, India y América. En el Boletín Oficial del Estado (BOE) se encuentra el Real decreto 1137/1984, del 28 de marzo, por el que se aprueba la Reglamentación Técnico-Sanitaria para la Fabricación, circulación y Comercio del Pan y Panes Especiales y que define pan como “el producto perecedero resultante de la cocción de una masa obtenida por la mezcla de harina de trigo y de agua potable, con o sin adición de sal comestible, fermentada por especies de microorganismos propios de la fermentación panaria.”

Existen multitud de tipos de pan: integral, con grañones, de Viena, biscote, Colines, enriquecidos, de molde, etc («BOE». 1984).

1.2.1 Proceso de elaboración del pan

El proceso de elaboración del pan comienza con la mezcla de todos los componentes de la masa, incluida la masa madre. Se produce así, una lenta hidratación del almidón mediante el amasado, al mismo tiempo que las partículas de gluten interaccionan entre sí dando lugar a una estructura tridimensional, donde todos los componentes se integran (Ambrogina Pagani et al., 2013).

Durante el horneado, a elevadas temperaturas, se producen las reacciones de Maillard y caramelización. Estas consisten en la interacción del grupo amino de las proteínas con el grupo aldehído de los azúcares dando lugar a una serie de características propias derivadas de la misma (Gobbetti et al., 1994a; Gobbetti et al., 1994b; Rothe and Ruttloff, 1983).

Tabla 4. Proceso de panificación: objetivos y modificaciones asociados con los principales procedimientos.
Fuente: (Ambrogina Pagani et al., 2013).

Paso	Objetivo	Modificaciones
Mezcla y amasado	Distribución homogénea de los ingredientes (incluyendo los componentes minoritarios)	Hidratación y solubilización en agua de los componentes. Formación de gluten soluble Inclusión de microburbujas de agua
	Formación de una estructura coherente y uniforme	<i>Formación de gas (CO₂)</i>
Reposo y fermentación	Inclusión de burbujas de aire	Producción de metabolitos en la fermentación importantes para el desarrollo del flavor y posibles cambios en la solubilidad de las macromoléculas
	<i>Incremento del volumen de la masa</i> Desarrollo del flavor de la masa	
Formado	Dar forma a la masa.	<i>Subdivisión de las burbujas de gas e inclusión de nuevo aire</i>
	División de la masa en piezas finales	
Horneado	Dar a los productos el aspecto típico	Incremento del volumen debido a la evaporación de los gases: 20-30% del volumen es obtenido durante el horneado (oven-spring)
	Disminución del contenido en agua	
	Estabilización del volumen y forma	Formación de corteza y miga
	Creación de un producto apetecible y digestivo	Desnaturalización de proteínas Gelatinización del almidón
	<i>Completo aumento del volumen de la masa.</i>	Desarrollo del flavor Evaporación del agua y etanol.
Enfriamiento	Embalaje del producto.	Cambio de la solubilidad de los azúcares
		Solidificación de grasas.

1.2.2 Principales efectos de la adición de masas madre sobre el pan

La adición de masa madre durante la elaboración de pan, supone no solo la adición de una serie de microorganismos ajenos a dicha elaboración, sino también un aumento de metabolitos derivados de la acción de los mismos durante varias fermentaciones y que producen cambios a diversos niveles.

Se pueden apreciar cambios en las propiedades de la masa a nivel tecnológico (mejora de la mecanización), nivel nutritivo (se produce la hidrólisis de fitatos), nivel de propiedades

organolépticas (volumen, textura de la miga y sabor) y de vida útil (conservación de las propiedades durante mayor tiempo).

1.2.2.1 Efectos tecnológicos

La adición de masa madre durante la elaboración del pan da lugar a productos con una serie de características propias que los diferencian del resto a nivel tecnológico:

- Mejor desarrollo de la masa: El tiempo de amasado se reduce, disminuye la tenacidad y reduce la extensibilidad, aumenta el volumen de gas retenido en la masa y en consecuencia se obtiene un pan de mayor volumen.
- Disminución del periodo de fermentación: se genera un aumento de la producción de CO₂ obteniendo así una masa con un menor pH. El aumento de la acidez total se debe a un mayor contenido de ácido láctico y acético, lo que favorece el desarrollo del volumen del producto, potenciando su aroma, sabor, textura y vida útil (Gil Hernández, 2009).

1.2.2.2 Calidad Sensorial

Durante la fermentación del pan elaborado con masa madre, se producen una serie de metabolitos (ácidos orgánicos, EPS y enzimas) que influyen en su calidad sensorial.

La fermentación produce mejoras en la textura del producto final debido a la solubilización de las macromoléculas y producción de EPS. Estos últimos pueden reemplazar a los hidrocoloides utilizados como mejorantes. La textura también está determinada por los valores de pH del medio. Cuando añadimos la masa madre se produce una disminución del pH debido a la adición de metabolitos ácidos. Además, comienza una nueva fermentación en la que se producen nuevos metabolitos ácidos. Estos ácidos orgánicos afectan directamente a la estabilidad de las proteínas y del almidón, ya que producen un aumento de la actividad de las proteasas y amilasas, lo que provoca la disminución del endurecimiento del producto final. La proteólisis producida durante la fermentación, da lugar a oligopéptidos y aminoácidos libres, estos son importantes para el crecimiento de los microorganismos, la acidificación del medio y como precursores del desarrollo del flavor de los productos horneados (Arendt et al., 2007; Rollán et al., 2005).

Respecto al flavor del producto, durante el proceso de fermentación se producen dos tipos de compuestos distintos:

- Compuestos no volátiles; derivados de la acción de las bacterias heterofermentativas, las cuales acidifican el medio disminuyendo el pH y generando así olores en la masa (Barber et al., 1985; Galal et al., 1978).

- Compuestos volátiles: alcoholes, aldehídos, cetonas, esterés y azufre, derivados de las acciones biológicas y bioquímicas que se producen durante la fermentación (Spicher and Nierle, 1984).

Aquellas masas fermentadas por bacterias heterofermentativas presentan una mayor aceptación en las evaluaciones sensoriales, son caracterizadas como agradables, suaves, con olores y sabores amargos. Sin embargo, aquellas que solo son fermentadas por bacterias homofermentativas, son caracterizadas con sabores metálicos, amargo y desagradables. La adición de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, a las masas aporta un sabor mas aromático (Katina et al., 2005).

Durante el proceso de horneado se producen nuevos compuestos volátiles derivados de la reacción de Maillard y la caramelización. Estas reacciones se producen a elevadas temperaturas y dan lugar a compuestos como son las pirazinas, pirroles, furanos y tiofenos entre otros muchos, con potentes sabores y olores (Rehman et al., 2006b).

1.2.2.3 Calidad nutricional

La adición de masa madre da lugar a una serie de mejoras nutricionales como es la reducción de la concentración de fitatos en la masa. Los fitatos son ácidos que producen la quelación de sustancias presentes en la dieta como son los compuestos fenólicos, esteróles, vitaminas y minerales, impidiendo así su absorción y aprovechamiento por el organismo. La adición de masa madre produce un aumento de la actividad de las enzimas, como en el caso de las fitasas, esto conlleva una reducción considerable del contenido de fitatos dando lugar a una mejor asimilación de compuestos como los anteriormente nombrados. Otras propiedades derivadas de esta adición serían: la solubilización de la fibra dietética; importante prebiótico, reducción de la digestibilidad del almidón; lo que produce un vaciamiento gástrico más lento y por lo tanto niveles glicémicos regulares durante más tiempo, degradación del gluten por hidrólisis de péptidos de prolamina, producción de péptidos bioactivos y síntesis de EPS que pueden actuar como prebióticos (Leenhardt, 2005).

Dependiendo del cultivo iniciador usado, se pueden adicionar aminoácidos deficitarios de cada cereal, aumentando así la calidad proteica del producto final (Katina and Poutanen, 2013).

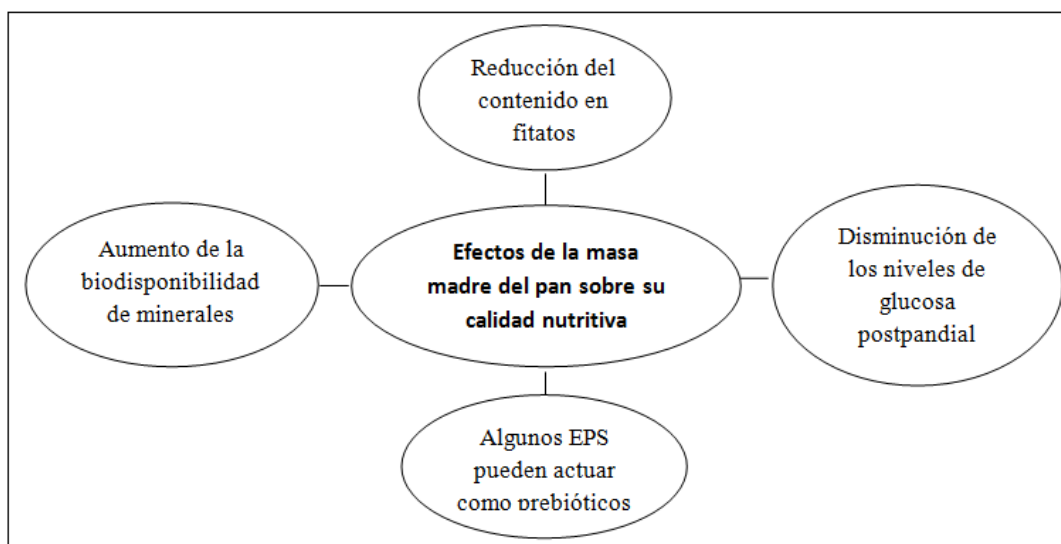


Imagen 2. Efectos de la masa madre sobre la calidad nutricional del pan (Arendt et al., 2007).

1.2.2.4 Vida útil

Se conoce como vida útil de un producto “El periodo de tiempo durante el cual resulta deseable el consumo de un producto alimenticio elaborado”. Durante el almacenamiento del pan y por la acción de los microorganismos de descomposición, se produce una disminución de la frescura paralela a un aumento de la dureza de la miga, esto se conoce como endurecimiento. A mayor rapidez de endurecimiento, menor vida útil y menor aceptación por parte del consumidor (Hebeda et al., 1991).

Se sabe que los panes elaborados con masa madre poseen una mayor vida útil. La acción de las BAL y de los metabolitos derivados de su acción, ralentizan el endurecimiento de la miga. Se producen sustancias antimicrobianas, bacteriocinas y una acidificación del medio, lo que repercute en la acción y por lo tanto en la velocidad de endurecimiento disminuyendolo (Elke et al., 2007).

1.3 Efectos sobre la salud

El consumo de panes elaborados con masa madre produce efectos beneficiosos sobre la salud como por ejemplo:

- Mejora los niveles de glucosa postprandial así como los niveles plasmáticos de insulina. La fermentación con masa madre produce una reducción de la digestibilidad del almidón debido a la formación de ácidos orgánicos. El ácido láctico disminuye la velocidad de digestión del almidón, mientras que el ácido acético y el ácido propiónico prolongan el tiempo de vaciamiento gástrico. La fermentación influye también en el grado de gelatinización del almidón disminuyéndolo, lo que produce una menor digestibilidad del producto. La integridad, porosidad y estructura del almidón influyen en la respuesta glicémica. Aquellos panes con harinas que den lugar a productos más rígidos

y menos porosos producirán una respuesta glicémica menor, con unos niveles glicémicos regulares durante más tiempo (Östman, 2003; Scazzina et al., 2009).

Sobre la disminución de la respuesta glicémica también influye el grado de proteólisis producido durante la fermentación y dependiente del pH. Durante la proteólisis se producen cantidades significativas de péptidos, aminoácidos y compuestos fenólicos libres (Cizeikiene et al., 2015).

- Reducción de alergias a las proteínas de los cereales. La celiacía se produce cuando determinadas proteínas de la harina, generalmente prolaminas, gluteninas y gliadinas, son detectadas por las IgE como perjudiciales, desatando una respuesta exagerada del organismo contra ellas. Durante la fermentación se produce la degradación de proteínas, entre ellas las anteriormente citadas, por lo que en algunos casos y dependiendo del nivel de tolerancia, se produce una reducción de los niveles de gluten en una proporción tal que pueden llegar a ser consumidos por este tipo de personas (De Angelis et al., 2007; Katina and Poutanen, 2013).

- Formación de péptidos bioactivos. Durante la fermentación se produce la degradación de proteínas dando lugar a determinados péptidos bioactivos. Estos péptidos poseen efectos beneficiosos sobre la salud. Principalmente afectan a funciones biológicas produciendo efectos; opioides, aumentando la bioasimilación de minerales, inmunomoduladores, antimicrobianos, antioxidantes, antitrombóticos, hipocolesterolémiantes y antihipertensivos (Coda et al., 2012).

- Reducción de la presión arterial. El consumo de panes elaborados con masa madre a los que se les ha disminuido la cantidad adicionada de sal y se les ha potenciado la acción de compuestos bioactivos como el GABA, inhibidor del ACE y los péptidos antioxidantes, han dado lugar a una reducción de la tensión arterial. Sin embargo, este campo debe ser mas estudiado (Peñas et al., 2005).

- Beneficios sobre la salud asociados al aumento del consumo de fibra. Aquellos panes con masa madre elaborados con un alto contenido en fibra dietética pueden ser considerados como alimentos que disminuyan el riesgo de sufrir enfermedades cardiovasculares, diabetes, hipertensión, obesidad y trastornos gastrointestinales. La adición de masa madre a estos panes enriquecidos en fibra da lugar a productos con una calidad superior en textura, sabor y vida útil, además favorece la asimilación de nutrientes (Katina et al., 2005).

- Aumento de la biodisponibilidad de micronutrientes y otras sustancias. La acción de BAL y microbiota produce una mejora de la asimilación de vitaminas y minerales, así como de otras sustancias presentes en menor cantidad, como es el caso de los fitoquímicos y EPS. Todos ellos producen efectos beneficiosos sobre la salud (Katina and Poutanen, 2013).

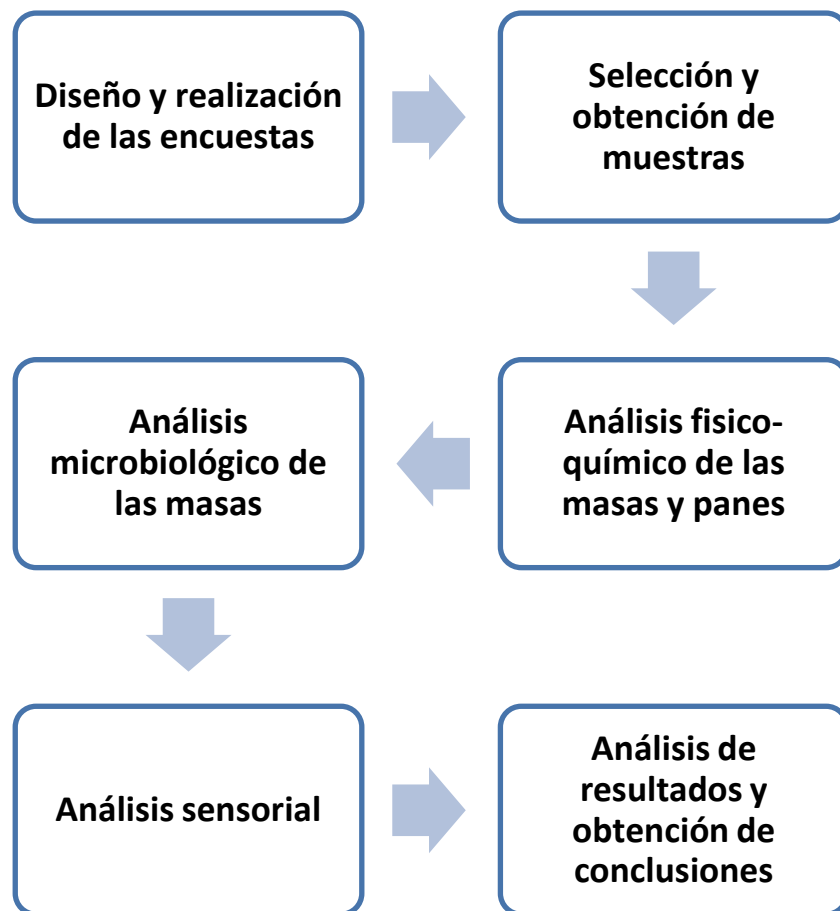
2. OBJETIVOS

El **objetivo principal** de este trabajo es investigar la influencia de las características de las masas madres sobre la calidad de los productos panarios resultantes.

Como objetivos secundarios se plantean:

- Caracterizar los métodos de elaboración y las características físico-químicas de las masas madres utilizadas.
- Caracterizar la microbiota de cada una de las masas madres mediante técnicas microbiológicas de cuantificación e identificación de microorganismos.
- Evaluar las características físico-químicas, tecnológicas y sensoriales de los panes resultantes.

Para la consecución de dichos objetivos se planteó el siguiente diseño experimental;



3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Diseño de cuestionarios y obtención de los resultados

Se generó una encuesta para recoger información sobre la elaboración, conservación y composición de las masas madres y de los panes obtenidos tras la adición de estas. Esta encuesta se basó en la ya realizada por L'homme, aunque con ligeras modificaciones (Lhomme et al., 2016).

La encuesta fue entregada en mano a los panaderos de cada una de las panaderías seleccionadas. La primera página contenía una breve presentación del estudio con la descripción de los objetivos del estudio y, a continuación, en la segunda hoja se adjuntaba la encuesta. Debido a la elevada carga de trabajo que presentaban los panaderos en el momento de entrega de la encuesta, esta fue realizada de manera autocumplimentada para que, de esta manera, pudiera ser contestada cuando les fuera posible.

Las respuestas de los cuestionarios fueron obtenidas por dos medios: mediante correo electrónico y por recogida del cuestionario en papel.

La encuesta (ANEXO 1) que constaba de 10 preguntas. Estaba dividida en dos partes; la primera parte, de la pregunta 1 a la 8, estaba dirigida a conocer los métodos de obtención, mantenimiento y composición de la masa madre. La segunda parte, las preguntas 9 y 10, estaba orientada a conocer la composición y proceso de elaboración del producto final.

El cuestionario fue diseñado con dos tipos de preguntas. Por un lado, respuestas de tipo cerrado con selección única y, por otro lado, de tipo abierto que debían de contener respuestas claras y concisas a las preguntas realizadas, como fueron: tipo y cantidad de harina utilizada, sal, levadura, etc.

Finalmente y tras realizar la encuesta a las 5 panaderías seleccionadas, se llevó a cabo una revisión de las respuestas y se generó la tabla 6 que, de manera sencilla y visual, permite comparar los resultados obtenidos.

3.2 Material estudiado

Las masas madre y los panes fueron obtenidos de cinco panaderías artesanales; por cuestiones de confidencialidad se creó un sistema codificado en el que se asignó al azar cada panadería con una letra, siendo estas: A, B, C, D, E. Además, tanto a las masas como a los panes se les nombrará por la letra asignada a la panadería de la que pertenecen, para poder ser diferenciados. Todos los productos estudiados fueron elaborados de manera tradicional. Las muestras fueron recogidas de las panaderías y trasladadas al laboratorio para su análisis, en el plazo de 8 horas.

3.3 Metodología para la caracterización de las masas madre

3.3.1 Análisis físico-químico

3.3.1.1 pH

El pH de la masa madre fue determinado mediante el equipo Crison pH-meter BASICS 20+ (Crison instrument, S.A., Barcelona, España), realizando las medidas por duplicado.

3.3.1.2 Determinación de ácido láctico

La determinación del ácido láctico se llevó a cabo mediante el Kit Megazyme (K-DLATE 07/14) para la valoración del D- Ácido Láctico (D-Lactato) y L-Ácido Láctico (L-Lactato). Este test está basado en un ensayo enzimático con D-lactato deshidrogenasa y D-glutamato-piruvato transaminasa y posterior lectura espectrofotométrica a 340 nm. Las medidas se realizaron por duplicado.

3.3.1.3 Determinación de ácido acético

La determinación del ácido láctico se llevó a cabo mediante el Kit Megazyme (K.ACET 02/11) para la valoración del Ácido Acético, basado en un procedimiento enzimático con Acetil-coenzima A sintetasa, citrato sintasa y L-malato deshidrogenasa, determinando la producción de NADH mediante incremento en la absorbancia en espectrofotómetro a 340 nm. Las medidas se realizaron por duplicado.

3.3.2 Cultivo e identificación de microbiota

El cultivo de microbiota se llevó a cabo por medio de siembras en diferentes medios selectivos. Cada una de las masas madre (10g) fue homogeneizadas en 90ml de agua de peptona (0.01%) y sometidas a la acción del Stomacher (AES Laboratories, Francia) durante 2 minutos. Posteriormente se elaboraron las diferentes diluciones que iban de la 10^{-3} a 10^{-7} por duplicado.

3.3.2.1 Recuento total de microorganismos.

Se realizaron recuentos totales de microorganismos presentes en las 5 muestras de masas madres, sobre placas de Agar TSA. Este medio está compuesto por: 15 g digerido pancreático de caseína, 5 g digerido papaico de harina de soja, 5 g cloruro sódico y 15 g Agar. Las placas se introdujeron en una estufa de 25°C durante 4 días. Tras este tiempo se realizó el recuento.

3.3.2.2 Recuento de BAL

Para la determinación de *Lactobacillus* y otras “Bacterias ácido lácticas” de las masas madre, se realizó una siembra en masa en el medio Agar M.R.S. Este medio contiene por litro: 18g mezcla de peptona, 4g extracto de levadura, 20g glucosa, 1ml Tween 80, 2g de fosfato dipotasio de hidrógeno, 2g citrato triamonio, 3g Acetato de sodio anhidro, 0.2g $MgSO_4$, 0.034g $MgSO_4$ anhidro, 12g agar. Con la finalidad de evitar el crecimiento de mohos, se le añadieron 5 ml de Piramicina a 10000ppm.

Las placas fueron introducidas en una jarra de anaerobiosis con 2 sobres de Anaerocult^R para crear un medio parcialmente anaerobio. Fueron incubadas durante 6 días en estufa a 30°C. Una vez seleccionadas las colonias de BAL se aislaron en Agar BHI; este medio contiene: 8g infusión de corazón y cerebro, 5g digerido péptico de tejido animal, 16g digerido pancreático de caseína, 5g cloruro sódico, 2g glucosa, 2.5g fosfato disódico de hidrógeno, 13,5g Agar. Se incubaron durante 5 días en una estufa de 30°C.

3.3.2.3 Recuento de Mohos y Levaduras

Para la determinación de mohos y levaduras se realizó una siembra en superficie sobre el medio selectivo Agar DRBC. Este medio contiene por litro: 5g peptona, 10g glucosa, 1g dihidrógeno fosfato de potasio, 0.5g sulfato de magnesio, 0.002g dicloran, 0.025g rosa de Bengala y 15g Agar. Las muestras fueron incubadas durante 6 días en una estufa de 25°C.

Una vez seleccionadas las colonias de levaduras y mohos, son aisladas en Agar TSA. Este medio contiene: 15g peptona de caseína, 5g peptona de harina de soya, 5g cloruro de sodio y 15 de agar. Fueron incubadas durante 5 días en una estufa a 25°C.

3.3.2.4 Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight ó MALDI TOF

El análisis de las muestras mediante espectrometría de masas MALDI TOF se realizó en el Edificio de Consultas Externas del Hospital Universitario Miguel Servet, en el laboratorio de Microbiología y Parasitología.

Esta herramienta es un espectrómetro de masas utilizado en el análisis y determinación de la composición elemental de una muestra mediante una ionización química de los compuestos, que genera moléculas cargadas con las que se puedan determinar una relación de masa-carga. Es utilizado en microbiología para examinar patrones de proteínas detectados directamente de los microorganismos, comparándolos e identificándolos (Biswas and Rolain, 2013).

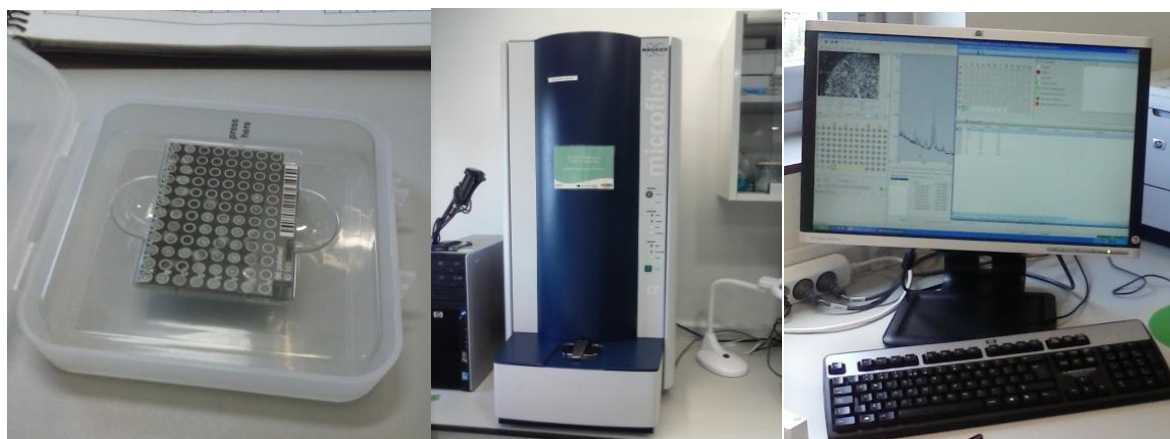


Imagen 3. Placa de muestras, MALDI TOF MS y programa Biotyper Realtime Classification.

Para la determinación de microorganismos mediante esta herramienta, es necesario realizar resiembras por agotamiento del microorganismo a estudiar el día anterior sobre un medio de cultivo nutritivo. Se utilizaron los mismos que hasta ese momento (BHI y TSA). De cada medio se pasaban las colonias seleccionadas a la placa de muestras. Se les aplicaba 1 ml de ácido fórmico y posteriormente otro de Matriz y se introducían en el MALDI TOF MS para realizar el reconocimiento. Se utilizó el programa Biotyper Realtime Classification para la obtención de los resultados.

3.4 Caracterización de los panes elaborados a partir de masa madre

Los análisis se realizaron en el laboratorio del grupo de investigación de alimentos de origen vegetal de la Universidad de Zaragoza en la Facultad de Veterinaria.

3.4.1 Análisis de la textura de los panes

Los atributos de textura de los panes se determinaron mediante un *test de análisis del perfil de textura* (TPA) aplicado con el TA.XT.plus Texture Analyser (Stable Micro Systems, Goalming, UK).

Los parámetros del test fueron los siguientes: célula de carga 5 Kg, velocidad de pre-test, de test y de post-test de 1,5 mm/s, con un tiempo entre los dos ciclos de compresión de 5 segundos y una distancia de penetración de 15mm. La compresión se realizó utilizando la sonda plana P36R. Se utilizó sobre 5 rebanadas de 2,5 cm de ancho, presionando sobre la miga de cada una de las muestras.

La doble compresión dio el análisis del perfil de textura del cual se obtuvieron los parámetros texturales (Figura 1):

Dureza: fuerza máxima que tiene lugar en cualquier tiempo durante el primer ciclo de compresión. Se refiere a la fuerza requerida para comprimir un alimento entre los molares, para cortarlo con los incisivos o entre la lengua y el paladar.

- **Fracturabilidad:** fuerza máxima con la que la muestra se desmorona, agrieta o rompe, incluyendo otros aspectos como la desmenuzabilidad, crocantez, cuscurrente y cómo de quebradiza es la muestra.

- **Elasticidad:** altura que recupera el alimento durante el tiempo que transcurre entre el final del primer mordisco y el principio del segundo mordisco.

- **Adhesividad:** Representa el trabajo necesario para despegar la sonda de compresión de la muestra o el trabajo necesario para despegar el alimento de una superficie, como el paladar. El área de esta fuerza es negativa.

- **Cohesividad:** relación entre el área de fuerza positiva durante la segunda compresión y la primera compresión.

- **Gomosidad:** energía requerida para desintegrar un alimento semisólido de modo que esté listo para ser tragado. Fuerza x cohesividad.

- **Masticabilidad:** trabajo necesario para desintegrar un alimento hasta que esté listo para ser deglutido. Se calcula como Fuerza x Cohesividad x Elasticidad.

- **Resiliencia:** Capacidad de un material para reasumir su forma o posición original tras haber sido sometido a una fuerza.

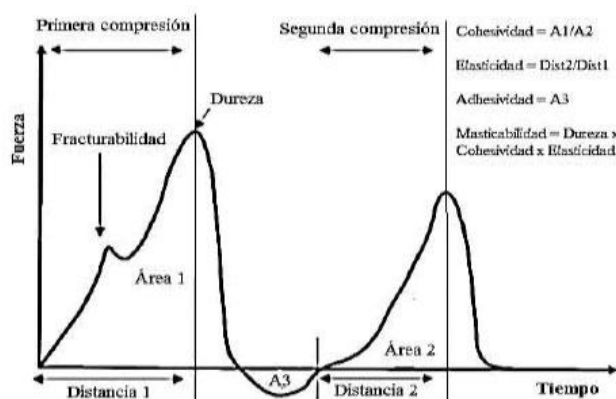


Figura 1. Gráfica que muestra los parámetros de análisis del TPA.

Se realizó también un *test de punción* con el fin de evaluar las características de penetración de la corteza. Los parámetros del test fueron los siguientes: célula de carga 5 Kg, velocidad de pre-test, de test y de post-test de 15 mm/s y una distancia de penetración de 15mm. La punción se realizó utilizando la sonda plana P2N. Se realizaron 6 punciones sobre la corteza de cada una de las rebanadas, de cada pan se realizaron 4 rebanadas de 4 cm de alto.



Imagen 4. Texturómetro realizando un test TPA (Izda) y el test de punción (Dcha).

3.4.2 Análisis de actividad agua (aw)

La actividad agua de las muestras se midió con el equipo LabMASTER-aw (Novasina, Switzland) a 25°C. Se realizaron seis mediciones de cada uno de los panes; tres de miga y tres de corteza. Las muestras fueron trituradas a mano para poder ser introducidas en el equipo (Imagen 5).

3.4.3 Análisis de Humedad

El contenido de humedad de las muestras se midió con el equipo Mettler Toledo HR73 Halogen Moisture Analyser. Se realizaron tres replicas de miga y tres de corteza de cada uno de los panes. Los resultados se expresaron como porcentaje de humedad respecto al 100% del peso en fresco (Imagen5).



Imagen 5. Equipos de medición Mettler Toledo HR73 (Izda) y Lab-MASTER- aw (Dcha).

3.4.4 Análisis del color del pan

El análisis del color del pan se realizó mediante dos métodos, uno utilizando un sistema calibrado de análisis de imagen y otro mediante un colorímetro portátil, en ambos casos se necesitó una serie de plantillas prediseñadas en el programa Microsoft Excel para la interpretación de datos, así como el software Adobe[®] Photoshop[®] CS5 para determinar el color de la corteza y miga de cada uno de los panes.

3.4.4.1 Obtención y análisis de imágenes con sistema calibrado.

Para evaluar el color de la corteza y de la miga del pan de cada una de las formulaciones se utilizó el método calibrado de análisis de imágenes. Se tomaron cuatro imágenes de la corteza y cuatro de la miga con una cámara PANASONIC LUMIX DMC-FZ7. Las muestras fueron iluminadas con focos de luz de día con una temperatura de color de 5400K dispuestos con una inclinación de 45° y una distancia de 32,5 cm. Las imágenes se obtuvieron en formato TIFF y fueron procesadas por el programa Matrox 8.0. Para determinar el color de la miga se seleccionó una ROI (Region Of Interest) conocida de 18,06 x18,06 mm y para el color de la corteza una ROI de 20,34x20,34. A partir de las coordenadas RGB de la superficie seleccionada de la imagen (ROI) y fueron reconvertidas a las coordenadas CIE L*, a*, b*, C* y h_{ab} (CIE 15,2004).

El sistema había sido previamente calibrado con las 300 muestras de la Norma UNE de color (UNE 48-103-94AENOR 1994). La coordenada L*, claridad, se define como la luminosidad de una superficie juzgada en relación a la luminosidad de una superficie que parece blanca o que posee una transmitancia elevada y está iluminada de idéntico modo. La coordenada a* se relaciona con la oposición visual rojo-verde y la coordenada b* con la oposición amarillo-azul. La coordenada C*, croma, representa el colorido de la superficie, evaluado en proporción a la luminosidad de una superficie iluminada del mismo modo, que parece blanca o que tiene una transmitancia elevada. Por último, la coordenada h_{ab}, tono, es el atributo de una sensación visual según el cual una superficie parece ser semejante a uno de los colores percibidos, rojo, amarillo, verde o azul o a una combinación de dos de ellos consecutivos.

3.4.4.2 Determinación mediante colorímetro

El color fue determinado con el aparato CHROMA METER CR-400 marca Minolta, mediante el programa CR-400 Utility. El color fue descrito en ejes de tres coordenadas. Las medidas de color se realizaron en el espectro visible y en el infrarrojo (intervalo de 360nm a 900 nm). A partir de estas medidas y utilizando el iluminante D65 y el observador CIE 31 obteniéndose los parámetros de color CIE (Comisión International de l'Eclairage): La coordenada L* representa la claridad, en una escala

de 0 a 100, siendo 0 negro y 100 blanco, se define como luminosidad de una superficie juzgada en relación a la luminosidad de una superficie que parece blanca o que posee una transmitancia elevada y está iluminada de idéntico modo. La coordenada a^* se relaciona con la oposición visual rojo (+) – verde (-) y la coordenada b^* con la oposición amarillo (+) – azul (-).

3.4.5 Análisis digital de imagen: Alveolado

Para la adquisición de las imágenes de las rebanadas de los panes se utilizó el escáner HP SCanjet G4010, con resolución 1200ppp, escala 100% y salida de millones de colores. Se escanearon las rebanadas de los panes obteniendo cuatro imágenes por tipo de pan. Las imágenes se almacenaron en formato TIFF. Las imágenes obtenidas fueron analizadas mediante el programa Matrox 8.0.

Una vez adquiridas las imágenes, se determinaron las características de la miga mediante la selección de un ROI (Región Óptica de Interés) conocido de 20x20mm en cada una de las rebanadas. Tras su calibración se convirtió la imagen a escala de grises (de 0, negro a 255, blanco) obteniendo su negativo y a partir de ese se realizó la segmentación según la intensidad de gris para obtener la zona de alveolos. Se necesitó una plantilla prediseñada del programa Microsoft Excel para obtener los valores finales de los alveolos.

Con cada ROI se calculó el número de alveolos de cada segmentación según su tamaño en mm^2 y el área total de la suma de alveolos de cada segmentación. Los alveolos se segmentaron en 6 grupos en función de su diámetro (Tabla 5).

Tabla 5. Rango de clasificación de alveolos.

<i>Grupo</i>	<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>	<i>5</i>	<i>6</i>
<i>Rango diámetro</i>	<0,1	<0,1-1	1-4	4-10	10-25	>25

3.5 Análisis sensorial

Con el fin de caracterizar las propiedades organolépticas así como el grado de aceptación de los panes, se realizó un análisis sensorial descriptivo con panel de catadores entrenado.

Se realizó una sola cata que se desarrolló en la sala de catas de la Planta Piloto de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Zaragoza. El panel de catadores estuvo formado por 4 hombres y 7 mujeres, con edades comprendidas entre los 23- 47 años, todos ellos miembros del grupo de investigación de alimentos de origen vegetal con experiencia en análisis sensorial y entrenadores específicamente en el análisis sensorial de productos derivados de cereales. Entre los panelistas seleccionados se encontraban dos catadores especializados en panes.

La sala estaba equipada con cabinas individuales a las cuales se les aplicó luz blanca para no interferir sobre los colores naturales de las muestras. Las muestras de pan fueron elaboradas en el día, y evaluadas a las dos horas después de la cocción del pan para asegurar que estas se encontraban a temperatura ambiente. Una porción de cada pan (incluyendo miga y corteza) fue presentado en un plato de plástico con un código de tres cifras a los panelistas, con órdenes de presentación aleatorios para cada catador. Se utilizó como material de referencia documentos consensuados por el panel así como imágenes y tablas de atributos de aspecto externo, aspecto al corte, aroma, sabor, textura y modo de evaluación. Los atributos fueron evaluados en una escala de 1 a 10 puntos (ANEXO 2).

En cada cabina se dispusieron las hojas de evaluación, los documentos del color, homogeneidad de miga y otros atributos y las cinco muestras de panes (todas de tipo Hogaza) sobre los platos previamente codificados (tres muestras en un plato y dos en otro) así como agua para el aclarado entre muestras. El orden de cata fue aleatorio (Imagen 6).

Al finalizar la cata, se recogieron los datos obtenidos de la evaluación y fueron codificados para, posteriormente, ser analizados por el programa SPSS. Para analizar y comparar los resultados se utilizó el test ANOVA.



Imagen 6. Cabina con las muestras de panes y las fichas dispuestas para la cata.

3.6 Análisis estadístico

El análisis de los datos físico-químicos y sensoriales se realizó mediante el programa estadístico IBM SPSS statistics 20. Los datos se sometieron a un análisis de varianza (ANOVA), mediante la comparación múltiple post hoc Duncan con un valor de significatividad $p < 0,05$. Posteriormente se elaboraron las correspondientes tablas personalizadas con las correspondientes medias y desviaciones típicas.

Con los datos del análisis sensorial se ha realizado un análisis de componentes principales (PCA) a partir de la tabla de medias de cada atributo entre todos los catadores. Se realizaron los mapas de proyección de atributos y de productos utilizando el programa SPSS.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Encuesta sobre el procedimiento de elaboración.

Se realizó una encuesta a cada uno de los panaderos que participaron en el estudio con el fin de poder obtener información sobre el proceso de elaboración de la masa madre y de panificación. Los datos obtenidos resultan de utilidad para el estudio de las características de los productos finales. Existen estudios previos (Lhomme et al., 2016) que destacan el interés de conocer las características del proceso.

El diseño de este cuestionario nace con el objetivo de conocer la composición y proceso de elaboración tanto de las masas madre, como de los panes. Pudiendo llegar a predecir o controlar estas posibles variables adquiridas.

Los datos solicitados a los panaderos (Tabla 6) incluyen las características de la harina, las condiciones de refresco e hidratación (%) y la temperatura de almacenamiento.

También se consultó sobre el proceso de elaboración del pan, en cuanto a formulación y tiempo de procesado.

Tabla 6. Características de la elaboración de la masa madre y del producto final.

<i>Panadería</i>	<i>A</i>	<i>B</i>	<i>C</i>	<i>D</i>	<i>E</i>
Produce su MM*	P	P	P	P	P
MASA MADRE					
Tipo de harina predominante en la MM	Trigo media fuerza	Trigo de fuerza	Trigo media fuerza + centeno	Trigo de fuerza	Trigo de fuerza
Refrescos a la semana	4	7	7	7	7
Hidratación de la MM (%)	33	40	33		30
Temperatura (°C) de almacenamiento	20	10 - 20	10	--	5
PAN					
MM (%)	24	10	9	--	14
Harina (%)	28	49	51	--	50
Agua (%)	48	39.5	38	--	30
Sal (%)	0.1	1	1	--	2
Levadura (%)	--	0.5	1	--	4
Método de amasado**	Me	Me	Me	--	Me
Periodo total de fermentación (horas)	6-7	4	2	--	3-4

*Produce su masa madre: Productor (P) ó No Productor (NP).

**Método de amasado: Mecánico (Me) ó Manual (Ma).

Como se refleja en la tabla la Tabla 6, todas las panaderías producen su propia masa madre. En todos los casos se utiliza harina de trigo de fuerza en su elaboración, sin embargo en la panadería C se complementa con harina de centeno, lo que según la bibliografía parece tener influencia en las características de los productos finales. La mayoría de las panaderías realizaba refrescos diarios,

menos la panadería A que los realizaba en días alternos. En cuanto a la hidratación de la masa madre y la temperatura de almacenamiento variaba en todas las panaderías.

Estos resultados son comparables a los obtenidos en el estudio de Lhomme (2016) en panaderías francesas. En el presente estudio todas las masas madres fueron de fabricación propia y mediante amasado mecánico, al contrario que en el estudio de Lhomme (2016) en el que dos de sus masas no fueron artesanas y una se realiza mediante amasado manual. La hidratación de las masas madres del estudio de Lhomme (2016) fue más elevada en todas sus muestras, así como la temperatura de almacenamiento. El resto de parámetros no presentó diferencias destacables (Lhomme et al., 2016).

La formulación de los panes fue diferente en todos los casos. Esto dará lugar a diferentes características ya que como se comentó en la bibliografía, las materias primas así como las técnicas utilizadas durante la elaboración del producto, determinarán las características finales de este.

4.2 Caracterización de las masas madres

4.2.1 pH

El pH fue determinado en las muestras de masa madre, obteniendo valores de entre 4,00 y 5,21 (Tabla 7). Los datos bibliográficos existentes indican que a partir de harina de trigo, se suelen presentar valores de pH de entre 3,5 – 6 (Rupesh and Shraddha, 2011), mientras que los panes de levadura se sitúan entre 5,3 y 5,8 (Corsetti, 2013). El pH juega un papel fundamental en el desarrollo de los productos de panadería ya, que la fermentación condiciona la actividad de las levaduras, la acción amilolítica y la actividad de la flora contaminante.

Tabla 7. Valores de pH de las muestras.

	<i>pH</i>
A	4,00 ± 0,03 ^a
B	4,01 ± 0,04 ^a
C	4,56 ± 0,01 ^d
D	5,24 ± 0,06 ^c
E	5,21 ± 0,11 ^c

Valor promedio ± desviación estándar. Letras diferentes superíndices indican diferencias significativas ($p = 0,005$) según prueba de comparación múltiple de Duncan.

Las masas A y B tuvieron los pH más bajos mostrando diferencias estadísticamente significativas con el resto de los panes. Los panes D y E tuvieron los valores más altos de pH mostrando diferencias estadísticamente significativas con los panes A, B y C. Este último, presenta un valor intermedio. En

general, se considera que un pH de entre 3,5 y 4,3 da lugar a una masa madre bien desarrollada (Martínez-Anaya; et al., 1994).

El pH tiene un papel determinante en el crecimiento de las BAL. Por ejemplo, *Lactobacillus sanfranciscensis* no puede crecer por debajo de pH 3,8 - 4, mientras que *Candida humilis* no se ve influida por el pH (Gobbetti et al., 2013).

Por tanto, la tasa de acidificación de la masa determina el nivel de *Lactobacillus sanfranciscensis* en la masa. Las masas madres naturales que presentan valores superiores de pH están a menudo dominadas por una microbiota diferente, formada por *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus* y *Weissella* que están habitualmente presentes en las harinas de cereales.

También el pH tiene un importante efecto sobre la acción de los enzimas hidrolíticos, fundamentalmente la α -amilasa, cuyo pH óptimo se sitúa en torno a 5. Su actuación se traduce en mayor presencia de dextrinas, y pequeñas cantidades de maltosa y oligosacáridos, compuestos que tienen una clara influencia en el grado de fermentación y por tanto en las características del producto final. Las masas D y E presentan un pH más próximo al óptimo de las amilasas.

Uno de los factores que influye en el pH que alcanzan las masas madre naturales es la altitud. Las masas A y B provienen de panaderías de pueblos con altitudes más elevadas respecto del resto. El proceso de fermentación de alimentos se ve afectado por la altitud respecto del nivel del mar, presentando aquellos alimentos fermentados a mayores altitudes unos niveles de pH menores que los mismos fermentados a altitudes más bajas (Cubero et al., 1992).

El pH también influye en el grado de desarrollo de la reacción de Maillard (Purlis, 2010), ya que valores de pH de entre 4 y 7 favorecen la formación de hidroximetilfurfural y furfural vía enolización. Estos compuestos participan en reacciones posteriores como es la condensación y polimerización, en las que favorecen la participación de melanoidinas, otros polímeros pardos responsables del color y de la formación de compuestos aromáticos. Por ello, el pH de las diferentes masas madre influirá en el color de la corteza y el desarrollo del aroma, si bien las bacterias lácticas condicionan la generación de sustratos de dicha reacción, y por lo tanto en sus efectos.

4.2.2 Ácido Acético y Ácido Láctico

Las bacterias lácticas producen entre otros metabolitos ácidos orgánicos como son el ácido acético y el ácido láctico. Estos metabolitos acidifican el medio produciendo cambios en la textura y sabor final del producto y alargando su vida útil ya que actúan como inhibidores de otros microorganismos presentes en la masa (Torrieri et al., 2014).

Los valores obtenidos de la valoración de ácido acético y ácido láctico muestran diferencias entre las masas madre. Los panes A y B presentaron valores semejantes tanto en ácido acético como en ácido

lático siendo, además, los más altos. Las masas madre D y C presentaron valores semejantes en la prueba del ácido acético, siendo los más bajos. El pan E, presentó un valor intermedio. En cuanto al ácido láctico, la masa C presentó valores normales ligeramente inferiores a las masas A y B. Las masas D y E presentaron valores muy bajos de ácido láctico, que junto con el pH más elevado, sugiere el predominio de levaduras frente a las bacterias lácticas.

Tabla 8. Valores de ácido acético, ácido láctico y proporción entre ambos en las diferentes masas madres.

	<i>Ácido láctico(g/L)</i>	<i>Ácido acético (g/L)</i>	<i>Ác. Láctico : Ác. Acético</i>
<i>A</i>	3,889	1,329	3:1
<i>B</i>	3,896	1,247	3:1
<i>C</i>	3,139	0,553	5.5:1
<i>D</i>	0,220	0,593	0,37:1
<i>E</i>	0,944	0,914	1,03:1

La relación entre el ácido láctico y el ácido acético es un parámetro importante a nivel tecnológico. La proporción óptima es de 3 (ácido láctico) y 1 (ácido acético) (Gänzle et al., 1998; Wehrle et al., 1997).

La proporción de estos en las muestras A y B fue óptima pues presentaron valores 3:1. Sin embargo en la muestra C, la proporción de ácido láctico se encuentra por encima de los valores óptimos.

La concentración de ácido acético y ácido láctico podría influir de manera positiva en las muestras A y B, pues poseen las concentraciones óptimas, dando lugar al desarrollo positivo de sacaromicetos, impidiendo el crecimiento de mohos, favoreciendo la elasticidad y extensibilidad del gluten lo que da lugar a panes con una miga densa y húmeda, con un importante componente ácido y una mejora de su aroma y sabor. Sin embargo en el caso de la muestra C, que presenta una mayor cantidad de ácido láctico frente al acético puede dar lugar a favorecimiento de mohos y bacterias, exceso de acidez lo que podría dar lugar a panes con migas mas prietas y húmedas, con corteza fina, gomosa y coloreada y un sabor excesivamente ácido.

De acuerdo con el artículo de Rehman (2006), el sabor del producto final está determinado entre otros factores por el ácido láctico y ácido acético producido por las BAL. Así la relación que exista entre ambos dará lugar al sabor final del pan. Como se comento en la bibliografía esta proporción entre los ácidos es debida a una serie de factores derivados de la composición de la masa.(Rehman et al., 2006a).

4.3 Caracterización microbiológica de las masas madres

Se realizaron diferentes tipos de recuentos. Por un lado se realizó un recuento total de microorganismos sobre placas de PCA. El recuento se realizó en todos los casos en la placa con la dilución 10^{-4} . Los resultados fueron expuestos en la tabla 9.

Tabla 9. Unidades Formadoras de Colonias por gramo de producto.

MUESTRA	UFC/g
A	$9,8 \times 10^4$
B	213×10^4
C	$>300 \times 10^4$
D	$>300 \times 10^4$
E	$>300 \times 10^4$

Las muestras C, D, E pudieron ser contabilizadas. Sin embargo, en el resto de placas se contabilizaron más de 300×10^4 UFC/g, lo que quiere decir que hubiera sido necesario haber realizado, al menos, una dilución mas para haber podido obtener resultados concluyentes. Con esto podemos concluir que las muestras C, D y E poseen una carga microbiológica superior al resto (A y B).

El recuento de BAL tan solo pudo realizarse sobre una placa de la muestra C. Esto fue debido a una contaminación de las placas de MRS por levaduras, aunque se les aplicó un antibiótico inhibidor para este tipo de microorganismo. La placa con la muestra C que sí pudo recontarse, mostró una concentración de $3,3 \times 10^3$ UFC/g, lo que es un recuento sumamente bajo si comparamos con estudios que también realizaron un recuento de este tipo como fueron el de Lhomme (2006) ó Voguelmann (2009) en el que los valores de BAL fueron de entre $1,3 \times 10^9$ y 9.7×10^{10} CFU/g (Lhomme et al., 2016; Vogelmann et al., 2009)

Al no haber obtenido resultados concluyentes del resto de las masas madres, no se pudo realizar una comparación entre estas.

Las levaduras presentes en las masas madres producen CO_2 y etanol, lo que se relaciona con un aumento del volumen del producto final y de su flavor (Corsetti and Settanni, 2007).

Tabla 10. Recuento de BAL y Levaduras en medios de cultivo.

Muestra	BAL (UFC/g)	Levaduras (UFC/g)
A		$1,1 \times 10^4$
B		$2,8 \times 10^5$
C	$3,3 \times 10^3$	$3,7 \times 10^4$
D		$2,7 \times 10^6$
E		$5,9 \times 10^6$

Respecto al recuento de levaduras se obtuvieron valores de entre 1,1 y 590×10^4 UFC/g (Tabla 10). Las muestras D y E tenían las concentraciones más elevadas de levaduras, mientras que las muestras A y C obtuvieron las menores concentraciones. La muestra B presentó un valor intermedio.

Los valores obtenidos, se encontraban dentro de los parámetros del estudio de Voguelmann (2009), sin embargo fueron, al igual que el de BAL, muy bajos en comparación con el recuento de Lhomme (2006), donde se obtuvieron valores de $8,4 \times 10^6$ y $7,6 \times 10^{10}$ CFU/g.

Tras el recuento, se realizó un análisis con MALDI TOF MS con el fin de identificar los microorganismos encontrados en las placas BHI y TSA. Al existir contaminación no se pudieron aislar cepas, lo que dio lugar a escasas identificaciones. Los resultados obtenidos se exponen en la tabla 11.

Tabla 11. Microorganismos identificados en las muestras de masa madre.

Muestra	Microorganismos	Levaduras
A	<i>Micrococcus terreus</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
B		<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
C		<i>Candida holmii</i> <i>Kazachstania exigua</i>
D	<i>Weissella confusa</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
E		<i>Saccharomyces cerevisiae</i>

La levadura *Saccharomyces cerevisiae* fue identificada en todas las muestras menos en la muestra C. En la muestra C, se identificaron las levaduras *Candida holmii* y *Kazachstania exigua*. Todos estos tipos de levaduras identificados aparecen en la bibliografía como microorganismos habitualmente presentes en las masas madres.

No se identificaron BAL habitualmente presentes en masas madres, pero sí dos tipos de microorganismos, en la muestra A; *Micrococcus terreus* un coco gran positivo y en la muestra D; *Weissella confusa* una BAL. Ninguno de estos microorganismos aparece en la bibliografía.

Según el estudio de Katina (2006), las masas madre que poseen *Weissella confusa* producen cantidades de dextrano polimérico e isomaltooligosacáridos sin necesidad de acidificación del medio, lo que da lugar a masas con una elevada viscosidad y panes con un aumento de la textura de la miga, de su volumen y vida útil (Katina et al., 2006).

El uso de MALDI TOF MS resultó ser una técnica fácil y útil en la identificación de microorganismos, pero al no disponer de colonias aisladas no se pudo realizar una correcta identificación de todos los microorganismos presentes (Kruppa and Daltonics).

Al poseer una pobre identificación de microorganismos de cada una de las masas madres, no se pueden asociar a otros datos obtenidos anteriormente como podría ser pH u acidez (Lhomme et al., 2016).

4.4 Caracterización de los panes.

4.4.1 Humedad y a_w

Los parámetros de humedad y a_w se midieron en los diferentes panes tradicionales con el fin de observar las posibles diferencias entre estos (Tabla 12).

Tabla 12. Valores de actividad agua y humedad del pan elaborado con las diferentes masas madre.

	a_w Miga	a_w Corteza	Humedad Miga (%)	Humedad Corteza (%)
A	$0,95 \pm 0,00^a$	$0,75 \pm 0,04^b$	$29,41 \pm 1,20^c$	$10,10 \pm 0,87^c$
B	$0,95 \pm 0,00^a$	$0,69 \pm 0,02^b$	$22,46 \pm 1,04^b$	$9,06 \pm 0,35^b$
C	$0,95 \pm 0,01^a$	$0,60 \pm 0,07^a$	$19,35 \pm 0,48^a$	$8,91 \pm 0,42^b$
D	$0,96 \pm 0,00^a$	$0,72 \pm 0,02^b$	$23,03 \pm 1,21^b$	$6,96 \pm 0,97^a$
E	$0,95 \pm 0,00^a$	$0,72 \pm 0,02^b$	$23,30 \pm 1,30^b$	$8,77 \pm 1,62^b$

Valor promedio \pm desviación estándar. Letras diferentes superíndices indican diferencias significativas ($p = 0,005$) según prueba de comparación múltiple de Duncan.

Los valores de a_w obtenidos de las diferentes muestras de los panes se situaron en el rango de 0,60 a 0,72 en la corteza y de 0,95 y 0,96 en la miga.

La a_w de la miga de los panes presento unos valores semejantes en todas las muestras, por lo que no había diferencias estadísticamente significativas entre sí como para poder ser comparadas.

La a_w de la corteza presentó su valor más bajo en la muestra C, siendo estadísticamente diferente al resto de panes (A, B, D y E) que presentaron valores superiores sin diferencias significativas entre sí.

Los valores de humedad de los diferentes panes tuvieron un rango de 29,41% a 6,96% presentándose los valores más altos en la miga y los más bajos en la corteza, como era esperable.

Atendiendo a la humedad de la miga, el pan A presento el valor más alto, mostrando diferencias estadísticamente significativas con el resto de las muestras de migas. La muestra C poseyó el valor más bajo, siendo estadísticamente diferente al resto. Y las muestras B, D, E tuvieron valores intermedios sin diferencias estadísticamente significativas entre sí.

Respecto a la humedad de la corteza se puede ver que la muestra D presentó el valor más bajo con diferencias estadísticamente significativas con el resto de las muestras. La muestra A, presentó el valor más alto con diferencias estadísticamente significativas con las muestras B, C y E. Las muestras C y E mostraron valores intermedios.

Los valores de a_w se encontraron dentro de los rangos establecidos por la bibliografía y fueron semejantes tanto en miga como en corteza, encontrándose tan solo una diferencia en la A_w de la corteza de la muestra C. Es por esto que no pueden ser comparados a este nivel los panes.

El pan A fue el pan que más capacidad de retención de agua tuvo junto con el pan B. Presentaron los valores de humedad más altos tras el horneado. Esto puede estar relacionado con los valores de ácido

láctico y acético, pues ambas muestras también poseen los valores más altos. Valores elevados de ácido láctico están relacionados con una mayor humedad de los panes. La humedad de los panes determina la suavidad final de estos (Gobbetti et al., 2013).

En el caso del pan C, la disminución de su humedad en miga puede estar debida al desequilibrio entre ácido láctico y ácido acético, que anteriormente se comprobó que se encontraba en una proporción 5,5: 1 lo que puede producir desequilibrios en la humedad del pan final.

Atendiendo a los valores de la humedad de la corteza podemos decir que el pan D fue el pan que al presentar un menor valor, podría estar relacionado con un mayor nivel de tostado durante el horneado y de la misma manera se aplicaría al resto de panes.

4.4.2 Análisis de textura mediante test TPA

La textura de los alimentos tiene una relación importante con la reología, que se define como “el estudio de la deformación y flujo de materias primas, productos intermedios y productos finales de la industria alimentaria” y está relacionada con la aceptabilidad de los alimentos. (García Calabuig, 2012). Las condiciones de proceso fermentativo tienen una clara influencia en la textura de los panes a los que son elaborados. Se ha descrito que los panes elaborados con masa madre, presentan mejores características texturales y que éstas, perduran en mayor medida durante la vida útil.

El test TPA ha demostrado ser una excelente herramienta en la evaluación de la consistencia de panes. En este caso se valoró las características de la miga de los diferentes panes (Imagen 7). Los parámetros de textura obtenidos con TPA (dureza, adhesividad, elasticidad, cohesividad, gomosidad, masticabilidad y resiliencia) de las muestras de los diferentes panes se presentan en la tabla 13.

Tabla 13. Resultados test TPA de los panes elaborados con masas madre.

	Dureza	Adhesividad	Elasticidad	Cohesividad	Gomosidad	Masticabilidad	Resiliencia
A	1549,36 ± 129,79 ^b	-0,22 ± 0,15 ^b	0,94 ± 0,03 ^a	0,52 ± 0,02 ^a	810,31 ± 89,85 ^b	761,04 ± 73,31 ^c	0,25 ± 0,02 ^a
B	278,16 ± 6,46 ^a	-2,20 ± 0,41 ^{ab}	1,24 ± 0,24 ^b	0,84 ± 0,02 ^c	232,75 ± 5,98 ^a	288,75 ± 54,55 ^b	0,52 ± 0,05 ^c
C	290,98 ± 5,37 ^a	-2,16 ± 2,53 ^{ab}	0,91 ± 0,02 ^a	0,79 ± 0,00 ^b	231,16 ± 4,35 ^a	210,80 ± 7,78 ^{ab}	0,43 ± 0,01 ^b
D	267,46 ± 40,70 ^a	-2,41 ± 0,63 ^{ab}	1,08 ± 0,12 ^a	0,84 ± 0,00 ^c	223,78 ± 33,19 ^a	244,39 ± 61,94 ^{ab}	0,54 ± 0,01 ^d
E	214,17 ± 10,64 ^a	-4,21 ± 2,27 ^a	0,99 ± 0,03 ^a	0,83 ± 0,02 ^c	177,14 ± 7,02 ^a	175,92 ± 1,46 ^a	0,48 ± 0,03 ^{bc}

Valor promedio ± desviación estándar. Letras diferentes superíndices indican diferencias significativas ($p = 0,005$) según prueba de comparación múltiple de Duncan.

El pan A mostro una dureza 5 veces superior al resto de los panes. Los panes B, C, D y E presentaron una dureza similar. La adhesividad fue semejante en los panes B, C y D. El pan E, presentó el valor de mayor adhesividad y el pan A el menor valor. El pan B, presentó el mayor nivel de elasticidad frente al resto de panes (A, C, D, E), los cuales presentaron valores semejantes. El pan que presentó menor cohesividad fue el pan A, seguido del pan C. Mientras que los panes B, D y E tuvieron los mayores valores de cohesividad, siendo semejantes entre sí.

Los valores de dureza de las muestras B, C, D y E son similares a los publicados en otros estudios de pan (Altamirano- Fortoul et al., 2013), pero la firmeza del pan A es muy superior a los datos previos.

La gomosidad y masticabilidad son dos parámetros que se comportan de forma similar. El pan A presento los valores más altos y el pan E presento los valores más bajos de ambos parámetros. El resto de panes presentó valores intermedios. Por último, el valor más elevado de resiliencia lo presentó el pan B y el menor valor el pan A, el resto de panes mostraron valores intermedios.

En esta prueba los panes con las características más diferenciadas fueron: el pan A, el cual presentó valores elevados de todas las variables. Y el pan E, pues presentó en todos los casos menos en la resiliencia los menores valores.

4.4.3 Análisis de textura mediante test de punción

El test de punción-penetración es un método que presenta utilidad para determinar las características de la corteza, ya que el desarrollo de la corteza durante el horneado está influido tanto por los ingredientes, como por los procesos de fermentación y horneado. Los parámetros de textura obtenidos a partir del test de punción penetración fueron la dureza y fracturabilidad, se presentan en la tabla 14.

La dureza de la corteza fue diferente en la mayoría de los panes. El pan E, mostro la menor dureza y el pan A la mayor respecto del resto de panes. Los panes B, C y D, tuvieron valores intermedios en los que el pan B mostro diferencias estadísticamente significativas con el pan D pero no con el E y a su vez el pan C fue semejante al pan D, pero no al E.

Tabla 14. Resultados del test de punción sobre los panes.

	Dureza	Fracturabilidad
A	3241,67 ± 177,06 ^d	1995,85 ± 186,75 ^c
B	2232,31 ± 157,88 ^b	774,32 ± 55,25 ^{ab}
C	2654,00 ± 161,59 ^{bc}	888,77 ± 87,68 ^b
D	2815,49 ± 97,28 ^{cd}	963,09 ± 60,16 ^b
E	1720,24 ± 99,09 ^a	497,30 ± 17,85 ^a

Valor promedio ± desviación estándar. Letras diferentes superíndices indican diferencias significativas ($p = 0,005$) según prueba de comparación múltiple de Duncan.

En cuanto a la fracturabilidad, el pan E, presentó el menor valor y el pan A el mayor. El pan A no mostró diferencias significativas con el pan B. El resto (B, C y E) no mostraron diferencias significativas entre sí.

Los datos obtenidos tanto en miga como en corteza, muestran que los panes A y E son los que presentan los valores más diferentes. Coincide en estos panes las principales diferencias en cuanto al pH de las masas, así como a los porcentajes de adición de masa madre y de hidratación de los panes.

Otros autores (Altamirano- Fortoul et al., 2013) establecieron correlaciones positivas entre la firmeza y los valores de actividad de agua y humedad, efecto también observado en nuestro estudio. El pan A, presenta los valores de humedad más elevados, asociados a una textura de miga más firme.

4.4.4 Alveolado.

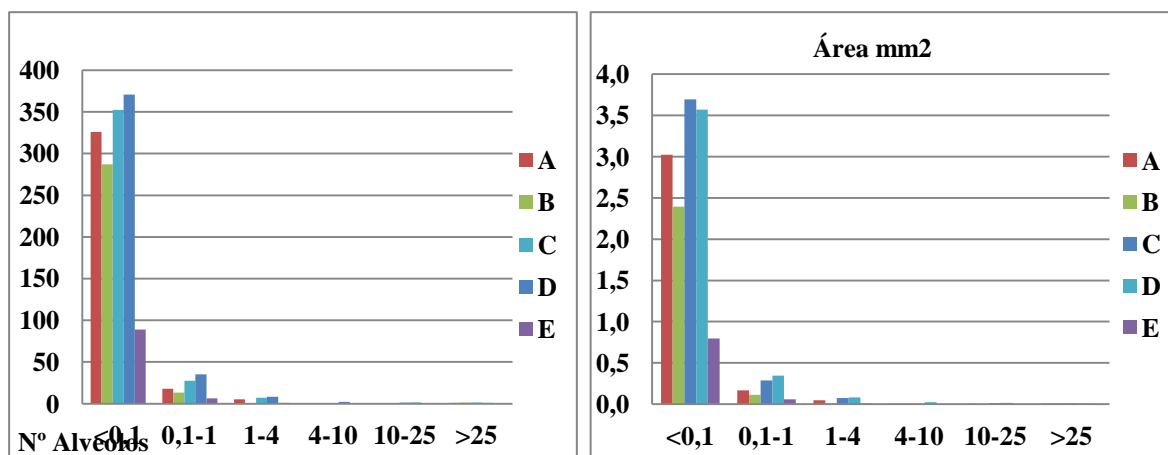
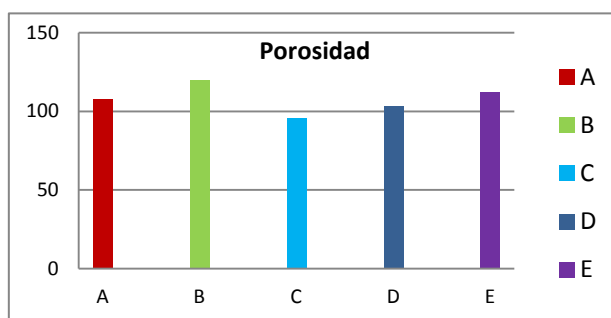
Se estudiaron las características estructurales de la miga mediante técnicas de análisis digital de la imagen (Imagen 7). Se calcularon tanto el número de alveolos totales y el área ocupada por estos (Figura 2), como la densidad de los mismos (Figura3).

Como se observa en las gráficas de la tabla 18, el tipo de alveolo predominante en todos los panes es el <0,1mm. Así mismo también es el tipo de alveolo que ocupa más área, seguido de los alveolos entre 0,1 y 1 mm.

El resto de los alveolos se presentan de manera menos habitual por lo que no existen diferencias significativas entre los panes.

Atendiendo al recuento de levaduras realizado en la tabla 10 de este trabajo, los panes que presentaron mayor número de alveolos y de área ocupada por los mismos coincidieron con los panes que presentaron un recuento de levaduras superior (muestras C y D).

Como se comentó anteriormente en la bibliografía, las levaduras dan lugar a la producción de CO₂ entre otros metabolitos, lo que puede explicar en este caso el mayor número de alveolos en estas muestras (Corsetti and Settanni, 2007).

Figura 2 . Número de alveolos según su tamaño y área que ocupan los alveolos según su tamaño.**Figura 3.** Porosidad de los panes.

Todos los panes presentaron una porosidad próxima a 100 alveolos cm^2 (Figura 3). El pan B, presentó la mayor porosidad respecto del resto, seguido por los panes A y E. El pan C poseía la menor porosidad de todos los panes, tal y como se observa también en las imágenes de los panes.

La cohesividad de los panes, si bien en ocasiones es cuestionada por los consumidores, tiene su importancia nutricional. Las masas más compactas con estructura cohesiva parecen disminuir la respuesta glicémica debido a que sus partículas son más resistentes a la digestión y el acceso a las amilasas es menor (Fardet et al., 2006). La información nutricional sobre el producto, se ha descrito como una herramienta de utilidad para vencer la resistencia del consumidor a la aceptación de panes más densas (Baixauli et al., 2008).



Imagen 7. Fotos de los panes estudiados. Las fotos de los panes superiores corresponden con las fotos de las rebanadas que se sitúan debajo de cada uno.

4.4.5 Color

El análisis de color se realizó tanto a la corteza como a la miga de los panes (Imagen 7). Se utilizaron dos métodos diferentes; por un lado se utilizó el Chroma Meter CR-400, el cual proporciona directamente como resultado las coordenadas CIE L^* , a^* y b^* (Tabla 15). Por otro lado, se realizó un análisis de las imágenes obtenidas por la cámara PARASONIC LUMIX DMC-FZ7. En este último caso se obtenían los parámetros R, G y B, teniéndolos que transformar en las coordenadas CIE mediante las fórmulas obtenidas del calibrado que se presentan en la tabla 16.

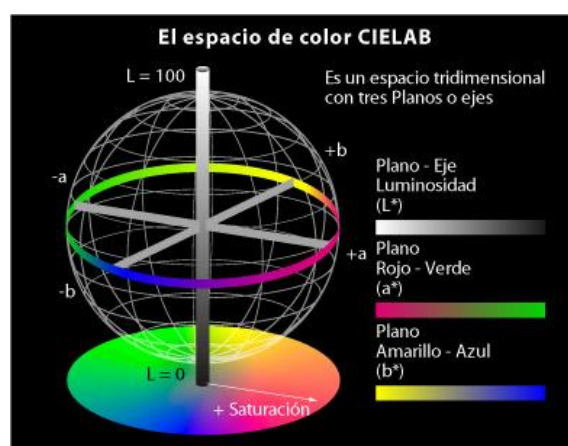


Imagen.9. Espacio de color CIELAB.

Medida del color mediante colorímetro

Los valores obtenidos con el colorímetro (tabla 15) sobre la corteza muestran que en la coordenada L^* que representa la claridad, el pan A presentó el valor más bajo con diferencias estadísticamente significativas frente a los panes C, D y E, pero no con el pan B. Este último presentó diferencias estadísticamente significativas tan solo con el pan E. El pan E obtuvo el valor más alto.

Tabla 15. Coordenadas CIE de color obtenidas por el Cromo Meter.

	Corteza			Miga		
	L^*	a^*	b^*	L^*	a^*	b^*
A	$44,82 \pm 4,45^a$	$12,58 \pm 1,64^b$	$27,98 \pm 2,86^a$	$62,07 \pm 2,64^a$	$-1,22 \pm 0,12^a$	$13,35 \pm 0,97^a$
B	$48,49 \pm 4,64^{ab}$	$13,38 \pm 2,26^b$	$30,07 \pm 3,06^a$	$65,90 \pm 2,91^{ab}$	$-1,16 \pm 0,33^a$	$15,15 \pm 1,83^b$
C	$50,98 \pm 5,14^{bc}$	$12,50 \pm 2,61^b$	$26,39 \pm 3,86^a$	$61,83 \pm 6,23^a$	$-0,61 \pm 0,31^b$	$13,45 \pm 1,98^a$
D	$52,37 \pm 7,15^{bc}$	$11,28 \pm 4,87^{ab}$	$26,00 \pm 6,47^a$	$68,03 \pm 4,12^b$	$-1,38 \pm 0,07^a$	$13,51 \pm 1,06^a$
E	$56,06 \pm 4,68^c$	$8,39 \pm 4,08^a$	$25,44 \pm 6,17^a$	$69,86 \pm 4,15^b$	$-1,22 \pm 0,25^a$	$12,90 \pm 1,02^a$

Valor promedio \pm desviación estándar. Letras diferentes superíndices indican diferencias significativas ($p = 0,005$) según prueba de comparación múltiple de Duncan.

La coordenada a^* representa la oposición visual rojo-verde. El pan E fue el valor más bajo presentando diferencias estadísticamente significativas con los panes A, B y C, pero no con el D.

La coordenada b^* representa la oposición visual amarillo-azul, al ser valores semejantes no hubo diferencias estadísticamente significativas entre los panes.

Los valores obtenidos de la miga muestran que en la coordenada L^* , los panes A y C poseen los valores más bajos, presentando diferencias estadísticamente significativas con los panes D y E, pero no con el B. Los panes D y E, presentaron los valores más altos sin diferencias estadísticamente significativas entre sí y con el pan B.

En la coordenada a^* , el pan C tuvo el valor más bajo, presentando diferencias estadísticamente significativas con el resto de panes (A, B, D y E). Estos últimos no mostraron valores con diferencias estadísticamente significativas entre sí. En la coordenada b^* , el pan B presentó el valor más alto y diferencias estadísticamente significativas con el resto de los panes (A, C, D y E). Estos últimos no mostraron significatividad estadística entre sí.

Estos valores mostraron diferencias de color entre los panes estudiados. Así pues en la corteza, el pan C mostró la mayor luminosidad seguido por los panes D y E. Los panes A y B poseyeron la menor luminosidad y por lo tanto poseían colores más oscuros. Esto puede estar debido al tiempo y grado de cocción, habiendo sufrido los panes más oscuros una mayor reacción de Maillard. Respecto al color, los panes A, C y D poseyeron una cromacidad marronacea, el pan E una cromacidad marrón con mayor inclinación hacia los colores verdosos y por último el pan B presentó colores más anaranjados.

En cuanto a la miga de los panes, la mayor luminosidad se presentó en el pan D, seguido por los panes B y C. Los panes A y E, presentaron una menor luminosidad y por lo tanto eran más oscuros. Atendiendo a las diferencias del color, los panes A, C, D y E presentaron colores marrones- grisáceos similares, cercanos al punto medio pero dentro de los tonos azulados. El pan B destacó del resto por poseer un ligero tono hacia el rojo.

Medida del color con cámara calibrada

Las coordenadas obtenidas de la corteza de los panes muestran que la coordenada L^* , que representa la claridad, presenta valores semejantes en todas las muestras obtenidas debido a que la desviación típica de la mayoría resultó muy elevada y por lo tanto no pueden ser comparadas. La coordenada a^* representa la oposición visual rojo-verde. La muestra E posee el valor más bajo, no presenta diferencias significativas con los panes B y D, pero sí con los panes A y C. Estos últimos presentan los valores más altos y tan solo muestran diferencias significativas con el pan E. La coordenada b^* representa la oposición visual amarillo-azul, las muestras D y E poseen los valores más bajos y muestran diferencias estadísticamente significativas con el resto de las muestras a excepción de la muestra C. La muestra A presenta el valor más elevado, mostrando diferencias estadísticamente

significativas con el resto de las muestras. Las muestras B y C, presentan valores intermedios no significativos entre sí.

Tabla 16. Resultados coordenadas CIE mediante análisis de imagen.

	Corteza			Miga		
	L*	a*	b*	L*	a*	b*
A	65,22 ± 13,52 ^a	14,23 ± 3,73 ^b	30,87 ± 3,89 ^c	81,31 ± 2,21 ^b	3,82 ± 0,20 ^b	20,42 ± 1,99 ^c
B	50,87 ± 0,80 ^a	11,93 ± 0,00 ^{ab}	18,95 ± 1,31 ^b	78,65 ± 0,61 ^a	3,14 ± 0,39 ^{ab}	17,65 ± 1,82 ^{bc}
C	52,04 ± 10,32 ^a	13,45 ± 1,38 ^b	14,07 ± 4,16 ^{ab}	81,17 ± 0,06 ^b	2,84 ± 0,19 ^a	14,13 ± 0,45 ^a
D	55,45 ± 2,55 ^a	11,60 ± 0,39 ^{ab}	8,50 ± 1,96 ^a	83,19 ± 1,82 ^b	3,15 ± 0,70 ^{ab}	18,25 ± 2,46 ^c
E	49,62 ± 2,58 ^a	7,51 ± 0,69 ^a	7,70 ± 0,22 ^a	81,83 ± 1,16 ^b	2,63 ± 0,08 ^a	15,07 ± 0,48 ^{ab}

Valor promedio ± desviación estándar. Letras diferentes superíndices indican diferencias significativas ($p = 0,005$) según prueba de comparación múltiple de Duncan.

Las coordenadas obtenidas de la corteza de los panes muestran que la coordenada L*, que representa la claridad, presenta valores semejantes en todas las muestras obtenidas debido a que la desviación típica de la mayoría resultó muy elevada y por lo tanto no pueden ser comparadas. La coordenada a* representa la oposición visual rojo-verde. La muestra E posee el valor más bajo, no presenta diferencias significativas con los panes B y D, pero sí con los panes A y C. Estos últimos poseen los valores más altos y tan solo muestran diferencias significativas con el pan E. La coordenada b* representa la oposición visual amarillo-azul, las muestras D y E poseen los valores más bajos y muestran diferencias estadísticamente significativas con el resto de las muestras a excepción de la muestra C. La muestra A posee el valor más elevado, mostrando diferencias estadísticamente significativas con el resto de las muestras. Las muestras B y C, presentan valores intermedios no significativos entre sí.

Los valores de la miga presentaron las siguientes características: En la coordenada L* el pan B presentó el valor más bajo mostrando diferencias estadísticamente significativas con el resto de los panes (A, C, D y E), los cuales no presentaron significatividad entre sus valores. La coordenada a* presentó sus valores más bajos en los panes C y E, no mostrando diferencias estadísticamente significativas entre sí ni con los panes B y D, pero sí con el pan A. Así mismo el pan A presentó el valor más bajo y tan solo presentó diferencias estadísticamente significativas con los panes C y E. Por último la coordenada b*, presentó su valor más bajo en los panes C y E, mostrando diferencias estadísticamente significativas con los panes A, B y D. Los panes A y D, presentaron los valores más elevados. Estos no mostraron diferencias estadísticamente significativas con el pan B, pero sí con el resto de panes.

Estos valores mostraron diferencias de color entre los panes estudiados. Así pues en la corteza, todos los panes mostraron una luminosidad semejante tendiendo a la claridad. Respecto al color, todos los

panes obtuvieron colores marrones característicos pero diferentes entre sí. El pan A mostró un color marrón con una clara tendencia al amarillo, seguido del pan B, el cual también presentó una tendencia al amarillo pero en este caso predominaba el color marrón. Los colores C, D y E presentaron colores marrones semejantes pero el color E tendía hacia el verde, el D hacia el azul y el C presento un color intermedio entre ambos.

Todas las migas poseen una claridad semejante, siendo el pan B el que presento los valores más bajos. El resto de los panes (A, C, D y E) poseen una luminosidad semejante. En cuanto al color, todos los panes presentan una coloración grisácea dentro del tono rojizo, eje a, pero en el caso del eje b, el pan A fue el que más tendió al color amarillo, seguido de los panes B y D, y situándose los panes C y E por debajo de estos hacia el tono azul.

La tabla 17, muestra los colores construidos en el software Adobe[®] Photoshop[®] CS5 a partir de las medias de cada coordenada de color obtenidas con el colorímetro Croma Meter, así como las tomadas por la cámara PANASONIC LUMIX DMC-FZ7.




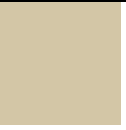




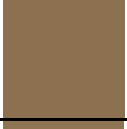
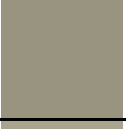



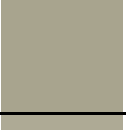






	<i>Colorímetro</i>		<i>Cámara calibrada</i>	
	Corteza	Miga	Corteza	Miga
A				
B				
C				
D				
E				

Tabla 17. Colores construidos a partir de las coordenadas CIE.

Al comparar los resultados de ambas pruebas, se puede comprobar que los colores obtenidos por ambos métodos no coinciden pues dan colores totalmente diferentes en la corteza y ligeramente más similares en la miga, pero sin llegar a coincidir.

Los colores de los alimentos se deben a distintos compuestos, principalmente orgánicos, algunos de los cuales son el resultado del procesamiento y manejo del alimento, pero también pueden ser

pigmentos naturales ó colorantes sintéticos añadidos. En el caso del pan, cuando se somete a tratamiento térmico desarrolla una tonalidad que puede ir desde el amarillo hasta un café intenso, debido a las reacciones de caramelización y de Maillard (Badui, 2006).

En el caso de la miga, también influirían los procesos anteriores.

4.4.6 Valoración sensorial.

Los catadores evaluaron las 5 muestras de panes. Los datos recogidos tras la cata fueron codificados y volcados al software informático SPSS, para su análisis de varianza a través del test ANOVA.

El primer análisis de datos determinó que no existían diferencias estadísticamente significativas en cuanto al color de la miga, percibido por el ojo humano y bajo una luz blanca, se refería. Sin embargo, sí que se detectaron a simple vista diferencias en la homogeneidad del alveolado.

El pan A tuvo el valor más pequeño, presentando diferencias estadísticamente significativas con el pan C, pero no con el resto de los panes. El pan C presentó el valor más elevado, mostrando tan solo diferencias estadísticamente significativas con el pan B. El resto de panes (A, D y E) mostraron valores intermedios. Esto quiere decir que el pan B fue el pan menos homogéneo y el pan C el más homogéneo.

Según el estudio de Baixauli (2008), variaciones durante de la composición ó elaboración del producto, pueden determinar las características y por lo tanto la calidad final del pan (Baixauli et al., 2008).

Las levaduras presentes en la masa madre o añadidas durante el proceso de elaboración, dan lugar a la producción de metabolitos y CO₂ lo que conduce a una serie de cambios sobre la estructura y volumen del producto final. Es por ello que aquellos productos que posean una mayor carga de levaduras, sufrirán una elevada producción de CO₂ y dependiendo de la resistencia que ofrezca la masa, surgirán un mayor o menor número de alveolos.

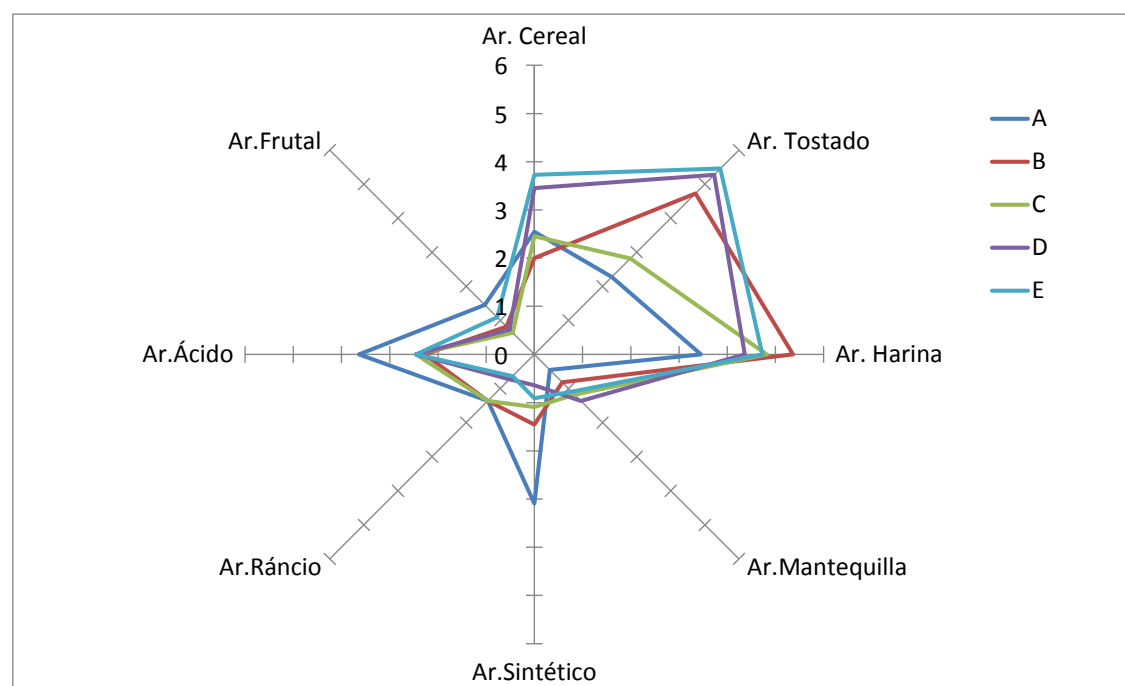
La tabla 18 contiene los datos obtenidos mediante el análisis ANOVA, de los posibles aromas presentes en los panes y a continuación, la figura 4 muestra los perfiles sensoriales de cada uno.

Tabla 18. Resultados de la media y desviación estándar de las categorías que varían significativamente entre las muestras de pan.

	Cereal	Tostado	Harina	Mantequilla	Maíz	Arroz	Sintético	Rancio	Ácido	Frutal
A	2,55 ± 0,25 ^a	2,27 ± 2,10 ^a	3,45 ± 2,07 ^a	0,45 ± 0,69 ^a	1,09 ± 1,76 ^a	0,91 ± 1,22 ^a	3,09 ± 0,91 ^b	1,36 ± 2,20 ^a	3,64 ± 3,44 ^a	1,45 ± 2,84 ^a
B	2,00 ± 2,24 ^a	4,73 ± 1,85 ^b	5,36 ± 2,11 ^a	0,82 ± 1,54 ^a	1,55 ± 2,58 ^a	1,45 ± 1,97 ^a	1,45 ± 2,21 ^{ab}	1,36 ± 2,69 ^a	2,27 ± 1,90 ^a	0,82 ± 1,17 ^a
C	2,45 ± 2,16 ^a	2,82 ± 1,83 ^a	4,82 ± 2,44 ^a	1,18 ± 1,72 ^a	1,73 ± 2,61 ^a	1,36 ± 1,63 ^a	1,09 ± 1,76 ^a	1,36 ± 2,06 ^a	2,45 ± 1,97 ^a	0,64 ± 1,12 ^a
D	3,45 ± 2,25 ^a	5,27 ± 2,33 ^b	4,36 ± 1,69 ^a	1,36 ± 2,69 ^a	2,00 ± 2,53 ^a	1,45 ± 1,51 ^a	0,64 ± 1,12 ^a	0,73 ± 1,42 ^a	2,4 ± 2,50 ^a	0,73 ± 1,42 ^a
E	3,73 ± 2,41 ^a	5,45 ± 2,66 ^b	4,73 ± 2,10 ^a	1,09 ± 1,38 ^a	2,55 ± 3,14 ^a	1,36 ± 1,91 ^a	0,91 ± 1,38 ^a	0,64 ± 0,92 ^a	2,45 ± 2,11 ^a	1,09 ± 1,81 ^a

Valor promedio ± desviación estándar. Letras diferentes superíndices indican diferencias significativas ($p = 0,005$) según prueba de comparación múltiple de Duncan.

La mayoría de las muestras no presentaron diferencias estadísticamente significativas entre el sí para el olfato humano. Cabe destacar que los panes B, D y E, presentaron diferencias estadísticamente significativas con el resto de los panes (A y C) en el olor a tostado. Sin embargo, el aroma a sintético poseyó diferencias estadísticamente significativas entre el pan A y los panes C, D y E, pero no con el B. Esto quiere decir que los panes A y B poseían mayor aroma a sintético que el resto.

**Figura 4.** Perfil sensorial del aroma de los panes.

Como se puede observar en la Figura 6; el pan D y E poseyeron los aromas de tostado y harina más intensos, seguidos por el pan B. El pan A, destacó por aromas predominantes respecto al resto de los panes a sintético y ácido. Los aromas a rancio, frutal y mantequilla recibieron las puntuaciones mas bajas, siendo semejantes en todos los panes.

El sabor a tostado de los panes es derivado de las reacciones de Maillard y caramelización, que son las responsables de la formación del sabor y del color en los productos derivados de los cereales. Los panes elaborados con masas madres, suelen poseer una mayor cantidad de aminoácidos libres por la acción derivada de la microbiota, por lo que se ve facilitada dando lugar a un aumento de la producción de metabolitos, entre ellos el sabor a tostado (Rothe and Ruttloff, 1983).

El uso de masas madres de trigo en la elaboración de panes, da lugar a productos más aromáticos y con unas características sensoriales mas deseables, esto es debido a la larga duración del proceso de fermentación (Bruemmer and Lorenz, 1991).

Atendiendo a las proporciones de microorganismos presentes en las masas madre, predominarán unos metabolitos u otros, dando lugar a unas características particulares y diferentes al resto, entre ellas el olor. La acción de la microbiota produce una serie de metabolitos que pueden, en mayor o menor medida, dar diferentes sabores como es el caso más claro del sabor ácido (Rehman et al., 2006a).

El estudio de Katina (2006) muestra que las masas madre de trigo que poseen o son suplementadas con la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, poseen aromas más intensos (Katina et al., 2006).

La figura 5 muestra el perfil sensorial de la textura.

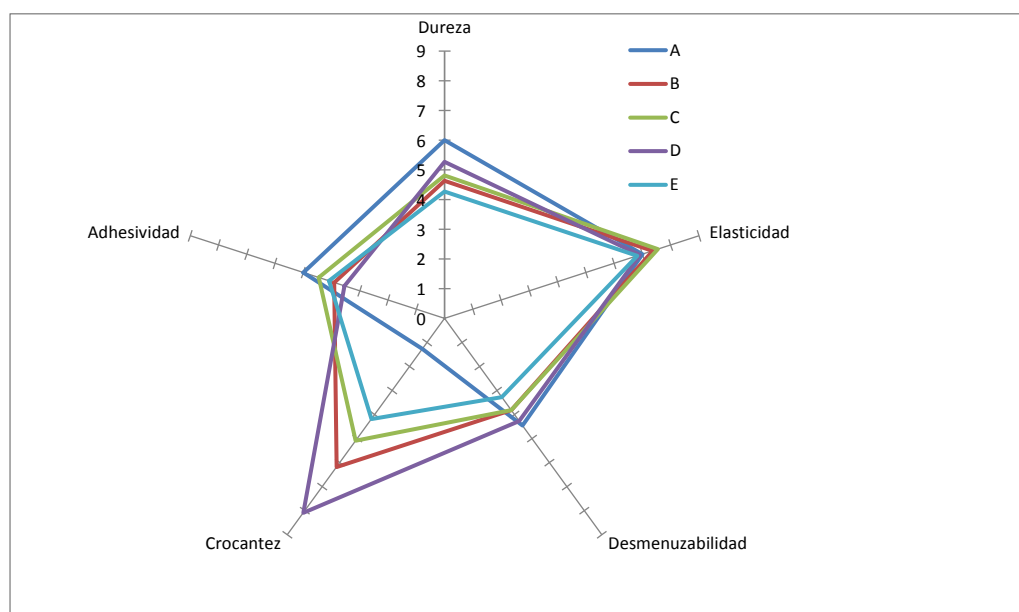


Figura 5. Perfil sensorial de la textura de los diferentes panes

Entre los parámetros medidos para la textura, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en cuanto a la elasticidad y desmenuzabilidad, pero sí se observaron diferencias en la crocantez. La crocantez presentó en el pan A el valor más bajo mostrando diferencias estadísticamente significativas con los panes B, C, D y E. El pan D, presentó el valor más alto mostrando diferencias estadísticamente significativas con el resto de los panes. Por último, Los panes B, C y E presentaron valores intermedios, siendo el pan B estadísticamente diferente al pan E, pero no al C. Esto quiere decir que el pan con una mayor crocantez fue el D, y el que menos el A.

Los panes poseen una vida útil corta y su calidad depende, entre otros parámetros, del tiempo de cocción y consumo (Hebeda et al., 1991). La textura está ligada a estos dos parámetros además de a los componentes del pan, entre ellos destaca el almidón, componente principal de los panes. Son determinantes los procesos por los que pasa el almidón, pues determinarán la textura del producto final: procesamiento, hidratación, interacción con otros componentes, gelatinización durante la cocción y retrogradación (Rehman et al., 2006a).

La figura 6 muestra el perfil sensorial de los posibles sabores que pueden aparecer en los panes.

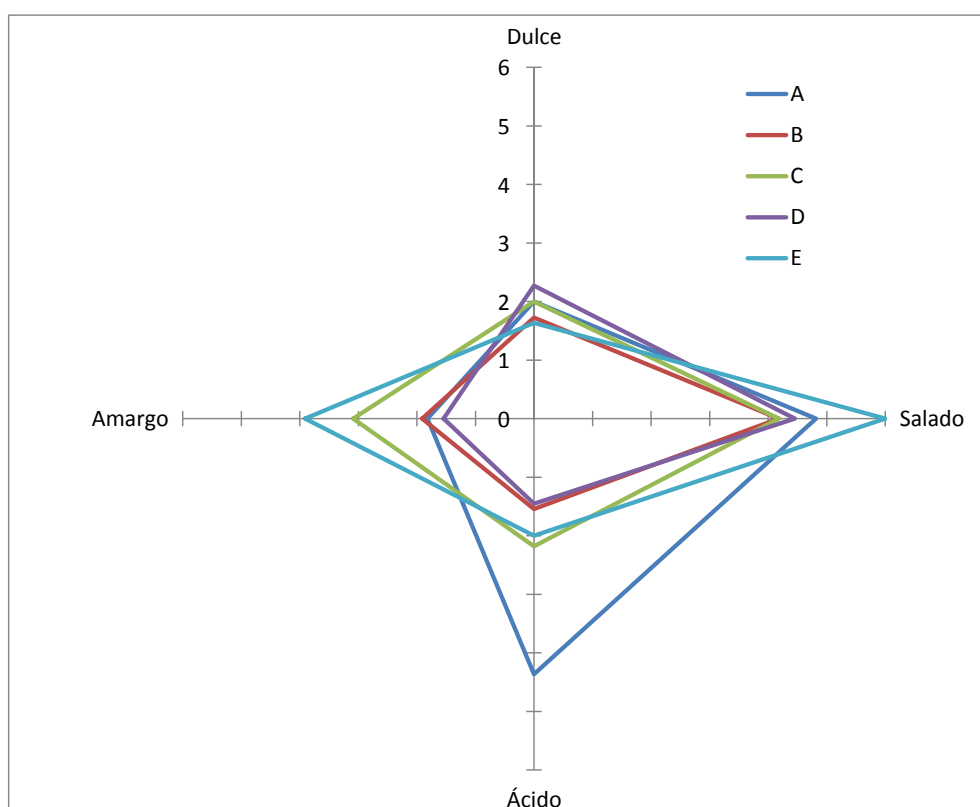


Figura 6. Perfil sensorial del sabor de los panes

Respecto al sabor salado, los panes B y D presentaron los valores más bajos mostrando diferencias estadísticamente significativas con el pan E, pero no con el resto de panes. A su vez el pan E mostró el valor más alto, aunque no presentó diferencias estadísticamente significativas con los panes A y C.

Los panes B y D eran menos salados que el resto de los panes, siendo el E el mas salado. Este resultado coincide con la tabla 6: Características de la elaboración de la masa madre y del producto final. Donde el pan E, posee el mayor porcentaje de sal adiciona durante su elaboración. No obstante y como se comento anteriormente en la bibliografía la adición de masa madre en los panes da lugar a cambios en su aroma y flavor (Rehman et al., 2006a).

El sabor ácido también presentó diferencias, siendo el pan A el más ácido y mostrando valores estadísticamente significativos con el resto de los panes. Esto puede ser debido a la acidez de la masa madre, ya que poseía el valor más bajo de todas las masas.

Por último, el sabor amargo presentó su valor más elevado en el pan E, mostrando diferencias estadísticamente significativas con los panes A, B y C, pero no con el D.

El tipo de harina utilizada en la elaboración de la masa madre así como en la del producto final, interviene de manera crucial en la adquisición del sabor ya que determinará la acción de las proteasas durante la fermentación, cantidad de compuestos volátiles, compuestos fenólicos presentes en la harina, etc (Arendt et al., 2007).

A partir de las tablas con los valores promedios de intensidad se llevó a cabo el análisis por componentes principales con el fin de proyectar sobre un mapa de dos dimensiones las variables sensoriales (atributos) y las muestras estudiadas. Este tipo de representaciones gráficas ayuda en la interpretación de resultados ya que permite establecer las correlaciones entre producto y atributo, así como visualizar qué muestras son más parecidas o distintas entre sí de acuerdo a su proximidad o distancia en el mapa.

La figura 7 muestra el resultado de dicho análisis. En cuanto al análisis de las variables, la primera componente del mapa explica un 47,40% de la varianza de las muestras mientras que la segunda dimensión explica un 74,78%.

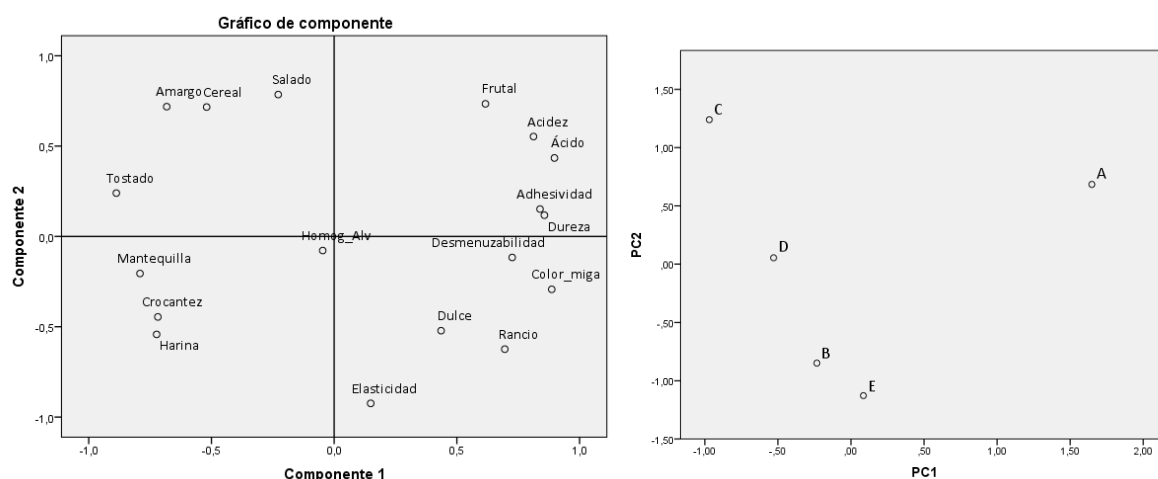


Figura 7. Análisis de componentes principales de los datos sensoriales

En el mapa de términos se puede observar una clara asociación entre los aromas y sabores ácidos y los frutales, asociados a un mayor metabolismo de bacterias lácticas. La muestra en la que dichos términos fueron percibidos con mayor intensidad corresponden a la muestra A, coincidiendo con los resultados del análisis físico-químico. La crocantez asociada al proceso de cocción y consumo destacó en los panes B y D, coincidiendo también con dichos valores.

Por otra parte, destaca también la asociación entre los términos de tostado y amargos, más asociados al proceso de elaboración, siendo en este caso la muestra C, la que presenta en mayor medida dichos atributos.

Teniendo en cuenta el posicionamiento de los panes, se puede concluir que la muestra A es significativamente diferente al resto de muestras en cuanto a sus características sensoriales.

5 CONCLUSIONES

- ✓ Las masas madres estudiadas que fueron obtenidas de panaderías artesanas aragonesas, se elaboran mediante técnicas tradicionales propias cuyos procedimientos presentan ligeras diferencias
- ✓ Se han caracterizado tanto las masas madre como los panes derivados de las mismas, y se han obtenido los atributos físico-químicos y sensoriales que permiten establecer las singularidades de cada masa.
- ✓ A nivel físico-químico, se han observado diferencias entre las masas, destacando el grado de acidificación de los productos así como la proporción en la que se encontraban sus metabolitos ácidos, los cuales influyen de manera directa en las características finales de los panes.
- ✓ La técnica de espectrometría de masas MALDI TOF es una herramienta para la identificación de microorganismos presentes en las masas madre, si bien requiere de la realización de las cepas a analizar para la obtención de resultados precisos.
- ✓ Las masas madres analizadas presentaron bajos recuentos microbianos, inferiores a los descritos en otros trabajos previos. Las levaduras identificadas en las masas madre estudiadas corresponden a especies habitualmente descritas, predominando *Sacharomyces cerevisiae* en la mayoría de las muestras analizadas.
- ✓ La adición de masa madre durante la elaboración de panes repercute significativamente en las características sensoriales y texturales finales, influyendo también la formulación y procesado del producto.
- ✓ Las técnicas de análisis de imagen permiten identificar características de los panes que presentan repercusión organoléptica y nutricional.
- ✓ Es necesario profundizar en el estudio de la ecología microbiana de las masas madre, en cuanto a un mejor aislamiento, identificación y estudio de la evolución de los microorganismos presentes en las mismas y los efectos sobre las características de los panes resultantes.

AGRADECIMIENTOS.

Me gustaría expresar mi más sincero agradecimiento a David Muñoz, María Rosa Vives, Luis Mariano Alegre, Raúl y Alfonso Pemán, Julio Martínez, Yolanda Muñoz, Jesús Ignacio Lana y Olivia Montañes por haber accedido a colaborar en la realización de este Trabajo Fin de Grado, ya que sin vuestra ayuda mediante la aportación de vuestros excelentes y singulares productos, este trabajo no hubiera sido posible.

Agradecer también al Dr. Domingo Blanco, profesor de la Universidad de Zaragoza en la Facultad de Veterinaria, su paciente y valiosa ayuda en el ámbito de la microbiología.

Al Grupo de Investigación de Alimentos de Origen Vegetal de la Universidad de Zaragoza, así como a todas las personas pertenecientes a este departamento por su colaboración y consejo. En especial me gustaría agradecer a Silvia Lorente y Ana Pilar Gracia su ayuda, consejo y dedicación a lo largo de la realización de este trabajo.

Mis agradecimientos también por su colaboración y tiempo, al personal del laboratorio de Microbiología y Parasitología del Edificio de Consultas Externas del Hospital Universitario Miguel Servet.

6 BIBLIOGRAFÍA

- «BOE». , P.d.G., 1984. Reglamentación Técnico-Sanitaria para la Fabricación, Circulación y Comercio del Pan y Panes Especiales. BOE LEGISLACIÓN CONSOLIDADA Real Decreto 1137/1984.
- Altamirano- Fortoul, R., Hernando, I., Rosell, C., 2013. Texture of bread crust: puncturing settings effect and its relationship to microstructure. *Texture studies*:1745-55.
- Ambrogina Pagani, M., Bottega, G., Mariotti, M., 2013. Thechnology of Baked Goods. *Handbook on Sourdough Biotechnology*:47-84.
- Arendt, E., Ryan, A., Dal Bello, F., 2007. Impact of sourdough on the texture of bread. *Food Microbiology* 24:165-74.
- Badui, S., 2006. *Quimica de los Alimentos*. Cuarta edición. Pearson Educación, México:401-38.
- Baixauli, R., Salvador, A., Martinez-cervera, S., Fiszman, S., 2008. Distinctive sensory features introduced by resistant starch in baked products. *LWT- Ciencia y tecnología de los alimentos* 41:1927-33.
- Barber, S., De Barber, C., Martinez Anaya, M., Martinez, J., ALberola, J., 1985. Cambios en los ácido orgánicos volátiles C2-C5 durante la fermentación de masas panareas perparadas con masas madre comerciales y con cultivos puros de microorganismos. *Rev.Agroquim. Technol. Alimentos* 25:223-32.
- Biswas, S., Rolain, J., 2013. Use of MALDI-TOF mass spectrometry for identification of bacteria that are difficult to culture. *Microbiological Methods* 29:14-24.
- Brandt, J., 2007. Sourdough products for convenient use in baking *Food Microbiology* 24:161-64.
- Bruemmer, J.M., Lorenz, K., 1991. Europeon development in wheat sourdoughs. *Cereal Food World* 36:310-12.
- Cizeikiene, D., Juodeikiene, G., Bartkiene, E., Damasius, J., Paskevicius, A., 2015. Phytase activity of lactic acid bacteria and their impact on the solubility of minerals from wholemeal wheat bread. *Food Science Nutricional* 66:736-42.
- Coda, R., Rizzello, C., Pinto, D., M., G., 2012. Selected lactic acid bacteria synthesize antioxidant peptides during sourdough fermentation of cereal flours. *Appl Environ Microbiol* 78:1087-96.
- Corsetti, A., 2013. *Technology of Sourdough Fermentation and Sourdough Applications*. *Handbook on Sourdough Biotechnology* 1:85-103.
- Corsetti, A., Settanni, L., 2007. Lactobacilli in sourdough fermentation. *Food Research International* 40:539-58.
- Cubero, E., Enríquez, G., Hernández, A., Rodríguez, T., 1992. Efecto de la altitud sobre el proceso de fermentación. *Turrialba* 42.
- Charmaine, I., Tilman, J., Dockery, P., O'Sullivan, K., Elke, K., 2004. Wheat Sourdough Fermentation: Effects of Time and Acidification on Fundamental Rheological Properties. *Grain science journal* 81:409 - 17.
- Chavan, R., Chavan, S., 2010. Microwave baking in food industry- a review. *Intern J Dairy Sci* 5:113-27.
- De Angelis, M., Rizzello, C., Scala, E., De Simone, C., Farris, G., Turrini, F., al., e., 2007. Probiotic preparation has the capacity to hydrolyze wheat protein responsible for food allergy. *Food Prot* 70:135-44.
- De Vuyst, L., Neysens, P., 2005. The sourdough microflora: biodiversity and metabolic interactions. *Trends in Food Science & Tecnology* 16:43 - 56.

- Decock, P., Cappelle, S., 2005. Bread technology and sourdough technology. *Trends in Food Science & Technology* 16:113-20.
- Elke, K., EK, A., Ryan, A., Dal Bello, F., 2007. Impact of sourdough on the texture of bread. *Food Microbiology* 24:165-74.
- Fardet, A., Fanny, L., Lioger, D., Scalbert, A., Rémésy, C., 2006. Parameters controlling the glycaemic response to breads. *Nutrition Research Reviews* 19:18-25.
- Galal, A., Johnson, J., Varriano-Marston, E., 1978. Lactic acid and volatile (C2-C5) organics acids of San Francisco sourdough French bread. *Cereal Chemical* 55:461-68.
- Gänzle, M.G., Ehmann, M., Hammes, P., W., 1998. Modeling of Growth of *Lactobacillus sanfranciscensis* and *Candida milleri* in Response to Process Parameters of Sourdough Fermentation. *Applied and Environmental Microbiology*:2616-23.
- García Calabuig, G., 2012. *Texturómetría Instrumental: Puesta a punto y aplicación a la tecnología de alimentos*. MBtA.
- Gil Hernández, A., 2009. Libro blanco del pan.1-208.
- Gobbetti, M., 1998. The sourdough microflora: Interactions of lactic acid bacteria and yeast. *Trends in Food Science & Technology* 9:267-74.
- Gobbetti, M., Corsetti, A., Rossi, J., 1994a. The sourdough microflora. Interactions between lactic acid bacteria and yeasts: metabolism of amino acids. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 10:275-79.
- Gobbetti, M., Corsetti, A., Rossi, J., 1994b. The sourdough microflora. Interactions between lactic acid bacteria and yeasts: metabolism of carbohydrates. *T Applied Microbiology and Biotechnology* 41:46-460.
- Gobbetti, M., De Angelis, M., Arnaut, P., Tossut, P., Corsetti, A., Lavermicocca, P., 1999. Added pentosans in breadmaking: fermentations of derived pentoses by sourdough lactic acid bacteria. *Food Microbiology* 16:409–18.
- Gobbetti, M., De Angelis, M., Corsetti, A., Di Cagno, R., 2005. Biochemistry and physiology of sourdough lactic acid bacteria. *Trends in Food Science & Technology* 16:57-69.
- Gobbetti, M., Gänzle, M., al., E., 2013. *Handbook on Sourdough Biotechnology*.1 - 285.
- Hammes, P., Gänzle, M., 1998. Sourdough breads and related products. In B. J. B. Woods, *Microbiology of Fermented Foods* 1:199–216.
- Hebeda, R., Bowles, L., Teague, W., 1991. Use of intermediate temperature stability enzyme for retarding staling in baked goods. *Cereal Food Wordl* 36:619.
- Huys, G., Daniel, H., De Vuyst, L., 2013. Taxonomy and Biodiversity of Sourdough Yeasts and Lactic Acid Bacteria. *Handbook on Sourdough Biotechnology*:108-57.
- Katina, K., Arendt, E., Liukkon, K., Autio, K., Flander, L., Poutanen, K., 2005. Potential of sourdough for healthier cereal products. *Trends in Food Science & Technology* 16:104-12.
- Katina, K., Heinio, R., Autio, K., Poutanen, K., 2006. Optimization of sourdought process for improved sensory profile and texture of wheat bread. *LWT-Food Science and Technology* 39:1189-202.
- Katina, K., Poutanen, K., 2013. Nutritional Aspects of Cereal Fermentation with Lactic Acid Bacteria and Yeast. *Handbook on Sourdough Biotechnology*:231-95.
- Kruppa, G., Daltonics, B., *Microbial Identification for the 21st Century; The MALDI Biotyper*. Bruker:1-38.

- Lhomme, E., Urien, C., Legrand, J., Dousset, X., Onno, B., Sicard, D., 2016. Sourdough microbial community dynamics: An analysis during French organic bread-making processes. *Microbiología de los alimentos* 53:41-50.
- Martínez-Anaya, M.A., Barber, C., Collar, e., 1994. Effect of processing conditions on acidification properties of wheat sour doughs. *International Journal of Food Microbiology* 22: 249-55
- Matz, S., 1996. *Química y tecnología de cereales como alimentos y piensos* Nueva York: Van Nostrand Reinhold 2.
- Östman, E., 2003. Fermentation as a means of optimizing the glycaemic index - food mechanisms and metabolic merits with emphasis on lactic acid in cereal products. Ph.D. thesis, Lund University, Department of Applied Nutrition and Food Chemistry.
- Parra, R., 2010. Bacterias ácido lácticas: papel funcional en los alimentos - Review. *Facultad de ciencias agropecuarias* 8.
- Peñas, E., Diana, M., Frias, J., Quílez, J., Martínez-Villaluenga, C., 2005. A Multistrategic Approach in the Development of Sourdough Bread Targeted Towards Blood Pressure Reduction. *Plant Foods Hum Nutr*:1-20.
- Posner, E., 2000. *Trigo. Manual de la ciencia y la tecnología de cereales* 130.
- Purlis, E., 2010. Browning development in bakery products – A review. *Food Engineering* 99:239-49.
- Rehman, S., Paterson, A., Piggott, J., 2006a. Flavour in sourdough breads: a review. *Trends Food Sci Technol* 17:557-66.
- Rehman, S., Paterson, A., Piggott, J., 2006b. Potential of sourdough for healthier cereal products. *Trends in Food Science & Technology*:557-66.
- Rollán, G., De Angelis, M., Gobbetti, M., De Valdez, G., 2005. Proteolytic activity and reduction of gliadin-like fractions by sourdough lactobacilli. *Appl Microbiol* 99:149–50.
- Rothe, M., Ruttloff, H., 1983. Aroma retention in modern bread production. *Die Nahrung* 27:505-12.
- Rupesh, S., Shraddha, R., 2011. A Traditional Way for Wholesome Foods: A Review. *Sourdough Technology*. 10:169 - 82.
- Scazzina, F., Del Rio, D., Pellegrini, N., Brighenti, F., 2009. Sourdough bread: starch digestibility and postprandial glycemic response. *Cereal Science* 49:419–21.
- Spicher, G., Nierle, W., 1984. The microflora of by lactic acid bacteria. In *Lactic Acid Bacteria sourdough*. *Unters. Forsch* 178:300-03.
- Spicher, G., Stephan, H., 1999. *Handbuch sauerteig, biologie, biochemie, technologie*. 5th ed. Hamburg : Behr's Verlag.
- Torrieri, E., Pepe, O., Ventorino, V., Masi, P., Cavella, S., 2014. Effect of sourdough at different concentrations on quality and shelf life of bread. *Food science and Technology* 56:508 - 16.
- Vogelmann, S., Seitter, M., Singer, U., Brandt, M., Hertel, C., 2009. Adaptability of lactic acid bacteria and yeasts to sourdoughs prepared from cereals, pseudocereals and cassava and use of competitive strains as starters. *Food Microbiology* 130:205-12.
- Wehrle, K., Grau, H., Arendt, E., 1997. Effects of lactic acid, acetic acid, and table salt on fundamental rheological properties of wheat dough. *Cereal Chem* 74.

ANEXO 1 – ENTREVISTA A LOS PANADEROS

- 1- Produce usted su propia masa madre a partir de ingredientes y técnicas tradicionales o por el contrario la adquiere mediante compra a proveedores externos a su empresa.
- 2- Si suele comprarla a proveedores externos a su empresa, ¿puede detallarnos la base del cereal?
- 3- ¿Qué harina (trigo, centeno, cebada...) y tipo (fuerza, floja, integral...) predomina en la composición de su masa madre?
- 4- ¿Incluye algún otro tipo de harina? ¿Cuál/es?
- 5- ¿De dónde procede el agua que usa para la elaboración de su masa madre (comprada, suministro local...)? ¿Es clorada o sin clorar?
- 6- ¿Cuántos refrescos de la masa madre realiza a la semana?
- 7- ¿Qué pesos ó porcentajes (☐% PANADERO ó ☐% TOTAL DE MASA) de masa madre, harina, sal y agua adiciona en cada refresco?
- 8- ¿A qué temperatura conserva la masa madre hasta ser usada?
- 9- Respecto del producto final y expresándolo en porcentaje ☐ PANADERO ó ☐ TOTAL DE MASA, indique que representa:
 - Harina:
 - Agua:
 - Masa madre:
 - Sal:
 - Levadura:
 - Método de amasado: ☐ Mecánico ☐ Manual
- 10- ¿Cuánto tiempo y a qué temperatura permanece el producto fermentando? Indicar si realiza más de una fermentación.

ANEXO 2. HOJA EVALUACIÓN ANÁLISIS SENSORIAL

ASPECTO AL CORTE

Color de la miga	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	blanco luminoso			ocre			pardo/gris				
Homogeneidad del alveolado	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	poca homogéneo					muy homogéneo					

ASPECTO EXTERNO

Color de la corteza	<hr/>											
Brillo de la corteza	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
	mate			brillante			muy brillante					
Cuardeado	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
	liso									muy cuarteado		

AROMA

Cereal	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	poca intenso					muy intenso					
Tostado	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	poca intenso					muy intenso					
Levadura	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	poca intenso					muy intenso					
Láctico	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	poca intenso					muy intenso					
Acético	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	poca intenso					muy intenso					
Mantequilla/Brioche	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	poca intenso					muy intenso					
Humedad/Mohoso	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	poca intenso					muy intenso					
Rancio	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	poca intenso					muy intenso					
Frutal	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	poca intenso					muy intenso					

TEXTURA

Elasticidad	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	poca elástica					muy elástica					
Desmenuzabilidad	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	poca friable					muy friable					

TEXTURA EN BOCA

Crocantez	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	poca crocante					muy crocante					
Dureza	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	muy blando					muy duro					
Adhesividad	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	poca adhesiva					muy adhesiva					

SABOR

Dulce	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	poca dulce					muy dulce					
Salado	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	poca salado					muy salado					
Ácido	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	poca ácido					muy ácido					
Amargo	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	poca amargo					muy amargo					